



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ASPECTOS CLÍNICO-ANDROLÓGICOS DE REPRODUTORES DA ESPÉCIE
EQUINA SUBMETIDOS A ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NO ESTADO
DA PARAÍBA

ALLAN GLEDSON FERREIRA DOS SANTOS

AREIA
2018

ALLAN GLEDSON FERREIRA DOS SANTOS

**ASPECTOS CLÍNICO-ANDROLÓGICOS DE REPRODUTORES DA ESPÉCIE
EQUINA SUBMETIDOS A ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NO ESTADO
DA PARAÍBA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, da Universidade
Federal da Paraíba, como parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em Medicina Veterinária.

Comitê de Orientação:

Prof. Dra. Sildivane Valcácia Silva - Orientador principal
Dr. Marlon de Vasconcelos Azevedo

**AREIA
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ASPECTOS CLÍNICO-ANDROLÓGICOS DE REPRODUTORES DA ESPÉCIE
EQUINA SUBMETIDOS A ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NO ESTADO
DA PARAÍBA**

Dissertação elaborada por
ALLAN GLEDSON FERREIRA DOS SANTOS

Apresentada em 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Sildivane Valcácia Silva
Orientadora

Dr. Helder Melo de Souza
Médico Veterinário Autônomo

Prof. Dr. Victor Netto Maia
Professor Adjunto da Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

“Ao meu primo, irmão e amigo, Albertone Ferreira, que partiu sem dar um abraço, nem uma palavra de despedida, hoje você está em um ótimo lugar, na presença do Senhor. Muito obrigado pela infância no sítio Lagoa da Cobra, Sumé-PB. Sempre sonhamos com cavalos e que um dia teríamos nosso haras. Negão, como sempre costumava falar, estou aqui na terra e vou lutar por esse nosso sonho se concretizar.

Dedico todos esses anos de estudo em sua memória”

Albertone Ferreira.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus por sempre me guiar nos momentos mais difíceis, me abençoando com muita saúde, paz. Obrigado, meu Deus.

Aos meus pais *Jose Estende Ferreira e Maria do Socorro dos Santos*, que sempre me deram força e apoio em todas as decisões tomadas na minha vida. Obrigado por sempre estarem do meu lado. Amo vocês.

Aos meus irmãos *Alisson Ferreira dos Santos, Kelvin Ferreira e Amanda Ferreira dos Santos*. Sempre vou querer o bem de todos vocês, e obrigado pela paciência que sempre tiveram comigo.

A minha sobrinha *Analice*, que Deus me proporcionou com seu nascimento na mesma data do meu aniversário. Sempre será a alegria da minha casa e minha vida. Amo-te sobrinha linda.

A minha namorada *Camilla Ingrid* que há anos vem do meu lado, sempre me dando apoio nas decisões, pessoa que sempre me proporciona a paz espiritual, nunca me abandonou nas horas mais difíceis. Obrigado meu amor por me fazer sonhar e lutar por uma família ao seu lado.

A meu amigo e irmão *Lucas Rodrigues*, mesmo distante sempre me deu orientações de como seguir na vida profissional. Obrigado, Deus, por ter me dado este irmão.

Aos meus mestres e amigos de profissão *Marlon de Vasconcelos Azevedo e Nathalia Mattos*, obrigado pela oportunidade de mesmo na residência proporcionaram a ideia de fazer mestrado com intuito do meu crescimento profissional.

A minha orientadora *Sildivane Valcácia Silva* mesmo sem saber minha procedência aceitou meu convite em me orientar. Quero agradecer por todo o conhecimento que adquiri nestes dois anos.

A todos os membros do **LABRA** por fazer de todas as segundas-feiras, dia de sabatina, um lugar de aprendizado e boas risadas, vocês são de uma inteligência fantástica.

A todos os doutorandos no **ANDROLAB** por fazer parte de todo meu experimento, sem a ajuda de vocês não teria chegado até aqui.

A todos que ajudaram de forma direta e indireta, meu muito obrigado.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

% Por cento

ΔF Desvio Frequência Doppler

μm Micrometro

$\mu m/s$ Micrômetros por Segundo

ALH Amplitude de deslocamento lateral da cabeça

AMPc Adenosina monofosfato cíclico

ATP Adenosina trifosfato

BCF Frequência do Batimento de Flagelo

C Velocidade do Som no Meio

CASA sistema automatizado para análise espermática

CBRA Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

ConA Concanavalina A

DCF Diacetato de Carboxifluoresceína

DNA Ácido Desoxirribonucleico

EDV Pico Diástole Final

F Frequência do Som Emitido pelo Transdutor

FITC Isoticianato de Fluoresceína

FITC-PNA Fluoresceína conjugada a *Peanut agglutinin*

Fr Frequência do Som Respiratório

FSH Hormônio Folículo Estimulante

Ft Frequência do Som transmitido pelo Transdutor

GnRH Hormônio Liberador de Gonadotrofina

HIOMT Hidroxiindol – O – metiltransferase

HOST Teste hiposmótico

Hz Hertz

IP Iodeto de Propídeo

LH Hormônio Luteinizante

LIN Linearidade

m/s Metros por Segundo

Mm milímetro

NAT N – acetiltransferase

Ph Potencial Hidrogeniônico

IP Índice de Pulsatilidade

PSA *Pisum satium*

PSV Pico Sistólico

PUFAs Ácidos graxos poli-insaturados

R\$ Reais

IR Índice de Resistência

TAMV Velocidade Máxima Média

V Velocidade do Alvo

VAP Velocidade Média do Trajeto

VCL Velocidade Curvilínea

VSL Velocidade Linear Progressiva

WGA *Triticum vulgar*

WOB Índice de oscilação

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a ultrassonografia Doppler com o exame clínico-andrológico e fertilidade de equinos no estado da Paraíba. Onze equinos da raça quarto de milha, com idade entre três a 27 anos foram utilizados neste experimento. Os ejaculados foram colhidos pelo método de vagina artificial e as amostras foram submetidas à avaliação de cinética espermática a campo e pelo sistema automatizado para análise espermática (CASA). Em seguida, os animais foram submetidos à avaliação do fluxo sanguíneo testicular com a ultrassonografia Doppler. Diferenças ($p < 0,05$) foram observadas entre os parâmetros de motilidade subjetiva avaliada a campo e no CASA. Avaliação da integridade da membrana espermática a campo foi semelhante ao teste de fluorescência. Animais idosos apresentam motilidade reduzida seguidos de um menor aporte sanguíneo na região testicular e baixa fertilidade. A ultrassonografia Doppler identificou que o Índice de Pulsatilidade tem correlação positiva com amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) do espermatozoide. Conclui-se que o exame clínico-andrológico, quando isolado, não determina a capacidade fértil de garanhões; a ultrassonografia associada ao método Doppler identifica animais subférteis e pode ser uma ferramenta auxiliar na seleção de reprodutores equinos com potencial fertilidade.

Palavras-chaves: fertilidade; índice de resistência; motilidade espermática.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the Doppler ultrasonography with the clinical-andrological examination and fertility of horses in the state of Paraíba. Eleven quarter horse equine animals, aged among three to 27 years, were used in this experiment. Ejaculates were collected by the artificial vagina method and the samples were submitted to field sperm kinetics and by computer-assisted sperm analyses (CASA). Afterwards, the animals were submitted to evaluation of testicular blood flow with Doppler ultrasonography. It was observed statistical differences ($p < 0.05$) between the parameters of subjective motility evaluated in the field and (CASA). Evaluation of sperm membrane integrity in the field was similar to the fluorescence test. Older animals have reduced motility followed by a lower blood supply in the testicular region and low fertility. The Doppler ultrasonography identified that the Pulsatility Index has a positive correlation with the amplitude of the lateral displacement of the head (ALH) of the spermatozoid. It is concluded that the clinical-andrological examination, when isolated, does not determine the fertile capacity of stallions; ultrasound associated with the Doppler method identifies subfertile animals and may be an auxiliary tool in the selection of equine reproducers with potential fertility.

Keyword: fertility; resistance index; sperm motility

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Anatomia do pênis do garanhão (A); Corte transversal. Fonte: adaptado de RIEGEL; HAKOLA (2004). 199
- Figura 2.** Esquema de ação de diferentes sondas utilizadas em testes de integridade de membrana plasmática. Fonte: SILVA; GADELHA (2006). 288
- Figura 3.** Esquema de ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI). Fonte: SILVA; GADELHA (2006). 299
- Figura 4.** Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo sistema CASA em uma trajetória irregular. Fonte: MORTIMER (2000). 33
- Figura 5.** Variação das ondas sonoras transmitidas e emitidas pelo transdutor em: A - objeto imóvel - a onda é refletida com mesma frequência que foi emitida, B – objeto com movimento em direção ao transdutor – a onda reflete com frequência maior que a emitida, C – objeto com movimento em direção contrária ao transdutor – a onda refletida com frequência é menor que a emitida. Fonte: ADAPTADO CARVALHO (2009). 366
- Figura 6.** Representação do efeito Doppler: O apito do trem tem alteração na frequência em relação á aproximação ou afastamento do receptor. Fonte: Adaptada de CARVALHO (2009). 377
- Figura 7.** Efeito do ângulo de insonação e a curva resultante do espectral Doppler em um vaso, na posição de perpendicularidade (90°) ocorre ausência de sinal.....38
- Figura 8.** Imagem ultrassonográfica Doppler – modo espectral. Forma de onda da velocidade do fluxo sanguíneo durante um ciclo cardíaco. Doppler Parâmetros de velocidade: PSV, velocidade sistólica de pico; EDV, final diastólico velocidade; TAMV, velocidade máxima média de tempo. Fonte: ORTIZ-RODRIGUEZ (2017). . 38

CAPITULO I

Figura 1. Imagem ultrassonográfica da artéria testicular em Modo B (A); Posicionamento do Modo Power Doppler no cordão espermático (B).....54

Figura 2. Corte transversal do cordão espermático. A. Modo Power Doppler de cor dos vasos do cordão espermático, exibição do método utilizado para medir um ciclo cardíaco usando Doppler pulsátil.....54

Figura 3. Parâmetros de motilidade espermática equina avaliados de forma subjetiva (Motilidade Total a Campo; M.T.C); e de forma objetiva (sistema automatizado para análise espermática; CASA).....55

Figura 4. Parâmetros de integridade de membrana plasmática (EO), funcionalidade da membrana plasmática (HOST) e integridade de membranas plasmática e acrossomal (CF) de equinos criados no estado da Paraíba.....55

Figura 5. Média dos parâmetros obtidos entre os animais submetidos aos exames clínicos (valores obtidos) e os valores de referência para a espécie equina, de acordo com cada parâmetro.....56

Figura 6. Função exponencial da variável motilidade espermática em função da idade dos garanhões avaliados no estado da Paraíba.....56

Figura 7. Relação do parâmetro ultrassonográfico índice de resistência (IR) testicular e a idade dos equinos criados no estado da Paraíba57

Figura. 8. Análise de correlação simples entre os Índices Doppler velocimétricos IR e IP e a análise objetiva do sêmen de equinos submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba.....57

Figura 9. Taxa de fertilidade dos reprodutores equinos submetidos aos exames clínicos andrológicos criados no estado da Paraíba durante o período de estação de monta.....58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Velocidade qualitativa de espermatozoides avaliados pelo sistema automatizado para análise espermática.....	344
--	-----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Anatomia do Aparelho Genital Masculino Equino	18
3.2	Endocrinologia da Reprodução do Garanhão	21
3.3	Espermatozoide Equino	22
3.4	Avaliação Seminal	24
3.5	Avaliações da Integridade Membrana Plasmática	25
3.5.1	Teste de integridade de membrana	26
3.5.2	Teste hiposmótico	26
3.5.3	Utilização de sondas fluorescentes na avaliação espermática	27
3.6	Análise Objetiva do Sêmen	30
3.7	Ultrassonografia Doppler	35
3.7.1	Princípios físicos da ultrassonografia.	35
3.7.2	Histórico e efeito Doppler	36
3.7.3	Fundamento do Doppler.	38
	REFERÊNCIAS	40
4	ARTIGO CIENTÍFICO	46

1 INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio equino no Brasil é uma atividade que movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 612 mil empregos diretos, sendo responsável por desenvolver cerca de 3 milhões de postos de trabalho de forma indireta (OBINO FILHO, 2016).

Destacam-se também no agronegócio equino os vários fornecedores de insumos, produtos, serviços para a criação, como medicamentos, rações, selas, acessórios, ferrageamento, veterinários, treinadores, transporte de equinos, ensino e pesquisa (AZEVEDO, 2015).

A partir da segunda metade do século XX, destacam-se a introdução do cavalo no aspecto social, nas atividades de esportes e lazer, na equoterapia auxiliando no tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócia afetiva (LIMA et al., 2006).

O Nordeste é o principal impulsionador deste desenvolvimento devido ao esporte da vaquejada, reunindo cerca de 600 animais em apenas uma única prova final de semana, este esporte provém da cultura sertaneja nordestina, como grande manifestação popular (AZEVEDO, 2015).

A importância econômica de um reprodutor da espécie equina é fundamental dentro da equinocultura brasileira, pois muitos animais de alto valor zootécnico são exigidos ao extremo durante repetidas estações de monta pelo alto valor de suas coberturas. Portanto, falhas na fertilidade destes garanhões esportistas acarretarão prejuízos econômicos consideráveis (HAMMES et al., 1996).

De acordo com Ginther (1992), a espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. Nesse aspecto é válido ressaltar a relevância do garanhão na reprodução equina, sendo ele o responsável por produzir um grande número de produtos por ano. Através de um único ejaculado pode fecundar várias éguas quando utilizadas modernas biotecnologias.

Desta forma, o exame andrológico passa a ser uma ferramenta de grande importância na comercialização de coberturas e garanhões, já que nas outras espécies domésticas, com raras as exceções, não são selecionadas pelo seu desempenho reprodutivo, e sim pelo seu pedigree, desempenho esportivo e outras características.

O exame do potencial de fertilidade de um garanhão inclui todas as etapas de um exame andrológico, e é indicado antes de iniciar a estação de monta, exposição, diagnósticos de sub ou infertilidade, ocorrência da puberdade, destinado a criopreservação de sêmen e comercialização (PAPA et al., 2011).

O exame andrológico é uma forma indireta de avaliar a fertilidade de garanhões. As principais causas de infertilidade equina são variadas, como cópula mal realizada, agentes patológicos e problemas na qualidade espermática. Cavalos que apresentam alterações no seu comportamento sexual devem ter uma atenção redobrada; levando em consideração o exame do sêmen, o que se objetiva é avaliação indireta, como a quantidade, qualidade, forma de armazenamento e o transporte no trato genital masculino.

Baseado na importância do mercado do cavalo e a identificação do crescimento deste setor, este trabalho objetivou avaliar a relação do exame andrológico, estudos ultrassonográficos e a fertilidade em equinos garanhões criados no estado da Paraíba.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Realizar exame clínico-andrológico em reprodutores equinos criados no estado da Paraíba.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer exame ultrassonográfico do testículo, epidídimo e funículo espermático de reprodutores equinos;
- Fazer exame ultrassonográfico com Doppler da região escrotal, testículo e funículo espermático de reprodutores equinos;
- Correlacionar o fluxo sanguíneo da região reprodutiva com a qualidade espermática de reprodutores equinos;
- Verificar a influência do exame ultrassonográfico na fertilidade de garanhões criados no Estado da Paraíba.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Anatomia do Aparelho Genital Masculino Equino

Para uma avaliação apropriada de um garanhão fértil, sub fértil ou que seja suspeito de algum problema reprodutivo, o entendimento da localização normal, forma e tamanho de cada órgão deve ser estudada e conhecida (AMANN, 2004). A genitália externa do garanhão é formada pelo pênis, prepúcio, uretra peniana, escroto, os testículos, epidídimos e o cordão espermático (SAMPER, 2000).

O pênis é o órgão responsável pela cópula, no qual é formado por uma base, corpo e glândulas penianas. É um órgão músculo-cavernoso composto por dois compartimentos independentes (CHENIER, 2000). A primeira estrutura do pênis é formada pelo corpo esponjoso e as glândulas da uretra, que se localiza em todo compartimento do pênis, constituindo o tecido cavernoso. Os espaços cavernosos juntam-se no nível das glândulas do pênis para formar o corpo esponjoso da glande. O corpo esponjoso da glande é responsável pelo crescimento acentuado das glândulas após estimulação do órgão. O corpo cavernoso é o segundo compartimento do pênis, que é o maior e estende-se por todo corpo do pênis; quando preenchido pelo sangue arterial, ocorre ereção peniana (Figura 1) (SAMPER, 2000).

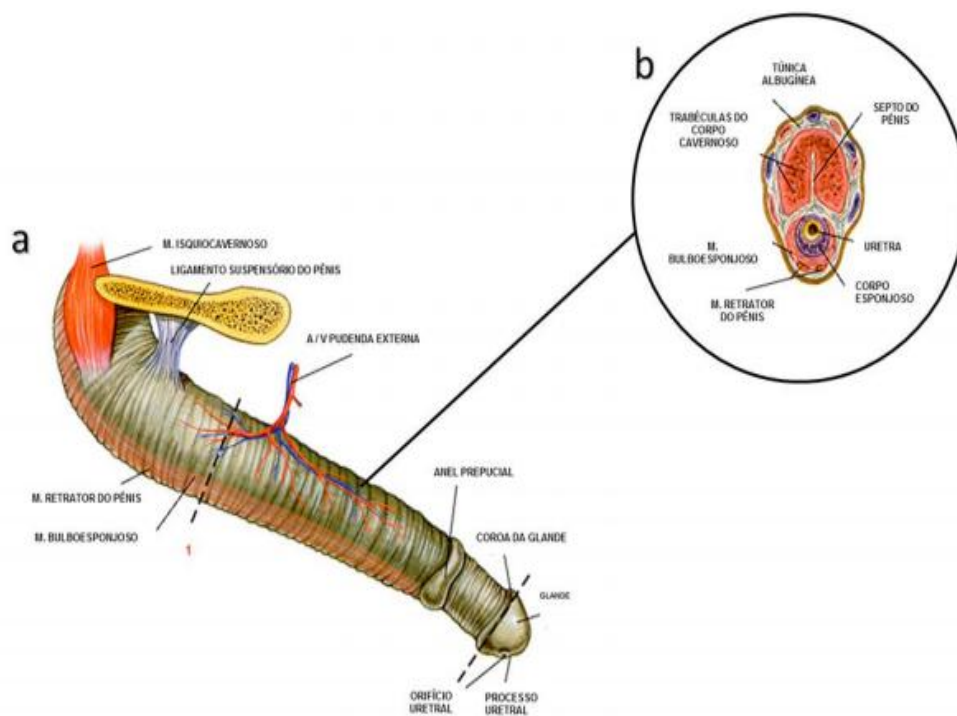
O prepúcio é composto por uma dupla invaginação de pele que contém e recobre a porção livre do pênis, quando não ereto. A parte externa estende-se do escroto até próximo à região umbilical, formando o óstio prepucial (SISSON, 1986). A camada interna percorre caudalmente ao óstio prepucial para formar a cavidade da parte externa do prepúcio. Esta camada forma, no interior da bainha, o prepúcio verdadeiro, local onde fica a parte cranial do pênis (GETTY, 2008).

A uretra peniana é uma estrutura tubular membranosa, que se inicia da bexiga e segue até o processo uretral na glande do pênis. A uretra finaliza na extremidade no pênis, junto à fossa da glande do pênis, que se divide em três divertículos uretrais, onde muitas vezes ocorre o acúmulo de esmegma (SAMPER, 2000).

O escroto é uma evaginação da pele composta por dois sacos escrotais, separador pelo septo escrotal (AMANN, 2011). O escroto de um equino é pendular e flexível. Durante a palpação ou temperaturas frias, esta estrutura pode ficar menor e os

testículos retraírem em direção ao abdômen. O escroto é envolvido por uma fina camada de pelo, glândulas sudoríparas e uma camada muscular, a túnica Dartos, sendo a estrutura mais importante para realizar a regulação da temperatura testicular (CHENIER, 2000).

Figura 1. Anatomia do pênis do garanhão (A); Corte transversal (B)



Fonte: adaptado de Riegel e Hakola (2004).

Os testículos são recobertos pela túnica albugínea, que realiza a sustentação e a divisão dos testículos em lóbulos (CHENIER, 2000). Na parte intersticial encontra-se os vasos sanguíneos, fundamentais no fluxo de entrada e saída de hormônios e nutrientes nos testículos, vasos linfáticos, nervos, tecido conjuntivo e as células de Leydig. O tecido intersticial é composto na sua maioria pelas células de Leydig, que são responsáveis pela produção de testosterona e hormônios esteroides (JOHNSON; THOMPSON, 1987).

Túbulos seminíferos convolutos dão origem aos túbulos seminíferos retos (*tubuli seminiferi recti*). Os túbulos seminíferos retos atuam como uma zona de passagem que

os espermatozoides passam do epitélio seminífero para o epidídimo, cada túbulo seminífero reto liga-se a 13 a 15 ductos eferentes que culminam no ducto epididimário (AMMAN et al., 1977). Estes são formados por células espermatogênicas, ou seja, as espermatogônias, espermátócitos e espermátides envolvidos pelas células de suporte, as células de Sertoli, responsável pela produção dos espermatozoides através da espermatogênese (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

Após o desenvolvimento das células germinativas, as células de Sertoli liberam as espermátides dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, passando pelo sistema de ducto coletor chamado de *rete testis* antes da sua passagem para o epidídimo. Durante esta passagem os espermatozoides passam por um processo bioquímico para se tornarem espermatozoides moveis e férteis (O'DONNEL et al., 2001).

O epidídimo é dividido em três segmentos: cabeça, corpo e cauda. A cabeça tem uma leve aderência ao testículo, onde se curva ao redor deste e continua como corpo do epidídimo. O corpo é cilíndrico e localiza-se até a superfície dorsal do testículo (AMANN, 1993). Pelo ponto de vista funcional, o epidídimo possui três segmentos: a cabeça proximal e o epitélio dos ductos eferentes, responsáveis pela absorção de soluto e fluído proveniente dos testículos; na porção média, estão cabeça e corpo, região de maturação dos espermatozoides; e o segmento terminal é formado pela cauda do epidídimo e a porção dos ductos deferentes, local onde se tem o armazenamento dos espermatozoides férteis (AMANN, 2011).

O ducto deferente é a continuação do ducto epididimário, que se prolonga da cauda do epidídimo, passando pelo cordão espermático até a uretra pélvica. Nos equinos, o ducto deferente possui uma parede de músculo liso espessa, sendo possível sua inspeção pela palpação escrotal. Próximo a uretra pélvica ele se dilata e comunica a ampola do ducto deferente. Esta ampola tem um diâmetro médio de 18 mm, diferente do ducto deferente, que possui entre 4 a 5 mm (AMANN, 2011).

As glândulas uretrais ou bulbouretrais são estruturas ovoides circundadas por uma musculatura, localizada caudal à próstata dorsal e à uretra pélvica. As secreções liberadas neutralizam o pH antes da ejaculação, através da liberação de fluidos límpidos

(SETCHELL, 1991). A próstata é uma glândula firme e nodular, com dois lobos estreitos, ligados pelo istmo (AMANN, 2011).

As glândulas vesiculares são duas estruturas alongadas localizadas cranialmente e ligeiramente lateral à próstata e às ampolas. Fisiologicamente são difíceis de serem palpadas. Sua função é produzir o fluido para última fração do ejaculado. Assim a secreção de fluidos vesiculares seminais e fluidos da próstata forma a porção do fluido do ejaculado (YOUNGQUIST, 1997).

3.2 Endocrinologia da Reprodução do Garanhão

A fisiologia da reprodução dos equinos possui uma relação direta com a sazonalidade das estações do ano. Ao longo da estação do ano, éguas e garanhões sofrem influência da intensidade e quantidade de luz ao longo do dia, que se alterna durante a época do ano (GINTHER et al., 2004).

Esta sazonalidade reprodutiva no estado selvagem tem importância reprodutiva, pois ela determina a época do ano em que os animais fazem o acasalamento, concentrando o nascimento dos potros nas estações de melhor oferta alimentar, com aumento na sobrevivência e crescimento dos animais (GINTHER et al., 2004). Um hormônio denominado melatonina, a qual é produzido pela glândula pineal, é responsável pelo efeito da sazonalidade reprodutiva nos equinos. A melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano por meio de duas enzimas principais, N-acetiltransferase (NAT) e hidroxiindol- O- metiltransferase (HIOMT); esta ativação ocorre devido a liberação de neurotransmissores, liberados durante a noite. Este hormônio é responsável pelo controle da secreção do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), que por sua vez, controla a secreção do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e do Hormônio Luteinizante (LH), relacionados diretamente com a espermatogênese nos machos (McKINNON, 1993).

Especificamente nos equinos, a melatonina tem a capacidade de bloquear a secreção de GnRH, ocasionando na redução da liberação de FHS e LH, influenciando negativamente sobre a espermatogênese. Acredita-se que a melatonina age diminuindo a

concentração intracelular de adenosinamonofosfato cíclico (AMPc) e bloqueia o influxo de cálcio nas células gonadotróficas da adenohipófise (PANG et al., 1998).

O hipotálamo, órgão que fica posicionado acima da hipófise, é o responsável pelo primeiro estímulo hormonal no ciclo reprodutivo dos equinos, por meio da liberação pulsátil de GnRH. Este hormônio, via porta hipofisária, atua na adenohipófise, sendo reconhecido pelas células presentes nesta, desencadeando a secreção dos hormônios FSH e LH, que pela corrente sanguínea atua nas células testiculares, resultando na produção dos esteroides, que atuam na formação dos espermatozoides (DELLAQUA et al., 2002).

O LH atua na produção e a liberação de testosterona e do estrógeno nas células de Leydig. A testosterona, quando em altas concentrações locais, atua na espermatogênese, com ações em diversos órgãos alvos, mantendo as características masculinas, a libido e desenvolvimento das glândulas sexuais acessórias. Já o FSH tem um papel importante na produção do espermatozoide, com atuação sobre as células de Sertoli e na regulação da produção de proteínas fundamentais para formação do espermatozoide, ou seja, a função gametogênica. Outros dois hormônios do sistema reprodutor chamados de inibina e ativina são responsáveis pela regulação do FSH, controle da quantidade de fluido seminífero tubular, manutenção da barreira hemato-testicular e a sustentação das células germinativas essenciais para a sustentação (SAMPER, 2000).

3.3 Espermatozoide Equino

O espermatozoide é constituído por cabeça, colo e cauda, apresentando diferentes composições físico-químicas em cada segmento. O comprimento da célula espermática é espécie-específico, variando entre 50 μm (suínos) a 90 μm (bovinos), ovino com aproximadamente 68 μm (BERGMANN, 2006).

As células espermáticas dos equinos apresentam cabeças com formato achatado, em forma de raquete, com dimensões aproximadas de 60-65 μm de comprimento total, 6-7 μm para o comprimento de cabeça, 10 μm para a peça intermediária, 40 μm para a peça principal e 4-5 μm para a peça final (MEYERS, 2009). A largura da cabeça possui

aproximadamente entre 3,5-4 μm no segmento equatorial do acrossoma, parte mais larga da célula, que contem também o núcleo (AMANN; GRAHAM, 1993).

A membrana plasmática que recobre toda célula espermática é composta por uma bicamada fosfolipídica com incorporação de moléculas de colesterol, que exerce função de estabilizar a membrana, carboidratos complexos e proteínas associadas a lipídios ou ao glicocálice. Algumas destas proteínas transmembranares auxiliam na formação de canais iônicos, poros, receptores ou componentes de transdução de sinal, constituindo no seu total cerca de 50% do peso molecular da membrana. A membrana plasmática encontra-se ancorada às estruturas subjacentes na região do acrossoma espermático, lâmina pós acrossômica e região do colo. Na cabeça do espermatozoide a membrana encontra-se dividida em duas regiões, a acrossômica, incluindo o anel celular periférico e a maior parte do acrossoma (MEYERS, 2009).

A cabeça do espermatozoide é composta por acrossoma e núcleo. O principal papel do acrossoma é fazer a ligação entre o espermatozoide e a zona pelúcida do oócito durante a fertilização (ABOU-HAILA; TULSIANI, 2000). Originário do complexo de Golgi, o acrossoma possui enzimas como glicohidrolases, proteases e esterases, que atuam na degradação da zona pelúcida (GADELLA, 2008).

Durante a exocitose do acrossoma, ou seja, a reação acrossômica, ocorre a fusão da membrana externa do acrossoma com a membrana plasmática, permitindo a atuação das enzimas sobre a zona pelúcida (MEYERS, 2009). Em sequência, ocorre a exposição do envelope nuclear, para liberação do conteúdo genético masculino, após contato com o oolema (GADELLA, 2008).

O núcleo possui ácido desoxirribonucleico (DNA) condensado, associado com proteínas nucleares denominadas protaminas. Estas consistem em proteínas de baixo peso molecular, que varia entre 27 a 65 aminoácidos, pH básico e ricas em arginina e cisteína (MEYERS, 2009).

Cabeça e a cauda do espermatozoide são articuladas pelo colo. O maior segmento da célula espermática é a cauda (peça intermediária, principal e final). A peça intermediária é caracterizada por uma bainha mitocondrial, composta por mitocôndrias dispostas na forma helicoidal, envolvendo o complexo axonemal e as nove fibras densas

externas (PESCH; BERGMANN, 2006). As mitocôndrias são responsáveis pela produção de maior parte da energia a partir da geração de ATP, possibilitando o movimento do espermatozoide (CÂMARA; GUERRA, 2008).

Segundo Valle e Silva Filho (2001), a passagem e a maturação dos espermatozoides mamíferos no epidídimo são acompanhadas por mudanças morfológicas e químicas da membrana, como o acúmulo de ácido siálico, carboidrato associado à glicoproteína, na superfície membranar, tornando o espermatozoide negativamente carregado, resultando em atração e adsorção de proteínas em regiões específicas da membrana plasmática.

O espermatozoide formado possui energia necessária para desempenhar suas funções, ou seja, estas células são capazes de efetuar troca gasosa com o plasma seminal ou com ambientes ricos em substâncias nutritivas e proteicas (MIES FILHO, 1982). Segundo Correia e Correia (1985), o plasma seminal produzido pelas glândulas acessórias (próstata, bulbouretrais e glândulas vesiculares) contém diferentes componentes, como açúcares, ácido cítrico, minerais e proteínas, correspondendo aos constituintes orgânicos do fluido seminal.

Esses autores descrevem ainda que a motilidade espermática é consequência da contratilidade do flagelo, promovida pela ação de proteínas presentes na cauda espermática. Desta forma, os ciclos de contração/relaxamento da cauda espermática resultam da atividade da ATPase, enzima que utiliza o ATP como substrato para produção de energia. Todavia, o metabolismo espermático ocorre de forma aeróbica e anaeróbica. Assim, em ambiente anaeróbico, a frutose é essencial para o metabolismo da célula espermática, e com a redução deste açúcar, a via anaeróbica deixa de produzir energia, recorrendo à parcial oxidação do ácido láctico (respiração exógena) e oxidação de componentes lipídicos intracelulares (respiração endógena).

3.4 Avaliação Seminal

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), o sêmen equino apresenta volume médio de 30 mL, vigor espermático 3, ausência de turbilhonamento, motilidade média de 70% e concentração de 9×10^9 espermatozoides por ejaculado. As características seminais sofrem alteração entre indivíduos da mesma

raça, diante disso, estas avaliações são de extrema importância para a seleção de um bom garanhão como reprodutor (McKINNOM, 1993).

Uma das avaliações de rotina é a motilidade espermática, que demonstra população de espermatozoides móveis presentes no sêmen. Para avaliação usa-se uma gota de sêmen depositada entre uma lâmina e lamínula pré-aquecida em 37 °C para avaliação no microscópio óptico, em objetiva com aumento de 10x até 40x. Segundo o CBRA (2013), garanhões com motilidade inferior a 70% no sêmen fresco e 30% no congelado não devem ser submetidos à reprodução.

A escala de vigor do sêmen é de zero a cinco, sendo zero a ausência de vigor e cinco o vigor máximo, e uma avaliação em conjunto com a motilidade, representando a força com que o espermatozoide se movimenta (CBRA, 2013).

A concentração espermática é representada pelo número de células por mL de sêmen. A contagem é determinada com o uso da câmara de Neubauer (FERNANDES, 2002). A análise da concentração espermática é fundamental para congelamento de sêmen e inseminação artificial, ou seja, quanto maior a concentração maior será o número de palhetas que podem ser congeladas e consequentemente o número de éguas inseminadas (PAPA, 2011).

3.5 Avaliações da Integridade Membrana Plasmática

Os testes utilizados na rotina de análise do sêmen consistem, basicamente, na avaliação da concentração, morfologia, motilidade espermáticas, volume, aspecto, odor e coloração recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Contudo, há evidências de que tais parâmetros, isoladamente, não são suficientes para estimar o potencial de fertilidade de um ejaculado. Sabe-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo de sua funcionalidade torna-se essencial, haja vista a grande influência de sua atividade bioquímica nos processos de capacitação espermática e fertilização. E, quando realizado junto aos parâmetros tradicionais de avaliação do sêmen, resulta em determinação mais precisa dos índices de fertilidade (LEBOUEF et al., 2006).

3.5.1 Teste de integridade de membrana

Os espermatozoides vivos obtidos de um ejaculado são facilmente identificados através da característica que a membrana plasmática apresenta que é a impermeabilidade a corantes, que comumente são componentes moleculares de tamanho superior à capacidade de difusão na membrana celular. A eosina, durante décadas tem sido utilizada para identificar estas células espermáticas lesadas. Este corante atravessa a membrana plasmática e fixa-se ao núcleo, o que confere cor rosácea aos espermatozoides mortos, mantendo-se incolores os espermatozoides vivos; a visualização dos espermatozoides vivos é facilitada pela adição à eosina de um corante de contraste, a nigrosina. A combinação eosina-nigrosina, além de permitir a identificação dos espermatozoides vivos e mortos, permite a avaliação morfológica dos espermatozoides (DOTT; FOSTER, 1972).

3.5.2 Teste hiposmótico

O teste hiposmótico (HOST) é indicado para avaliar a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide. Essa membrana tem característica de permitir o transporte de moléculas de forma seletiva, provocando aumento de volume ou ingurgitamento do espermatozoide, observado na cauda (DREVIS, 1972). Devido à capacidade de a cauda espermática enrolar quando em contato com solução hiposmótica, demonstra que ocorreu o transporte de água através da membrana sinalizando que a membrana encontra-se íntegra. Diante disso, o enrolamento da cauda tem relação direta com a funcionalidade da membrana presente na cabeça do espermatozoide (JEYENDRAN et al., 1989).

Desta forma, a membrana espermática funcional tem relação direta com a motilidade, visto que a membrana intacta tem grande relevância e correlação positiva no processo de capacitação espermática (TAKAHASI et al., 1990). Na espécie equina, o teste hiposmótico pode ser uma ferramenta de predição da capacidade de identificar quais garanhões possuem células espermáticas aptas para suporta o resfriamento e criopreservação (HENRY; BEKER, 2005). Apesar da relativa simplicidade do HOST, vários pontos podem ser trabalhados para torná-lo um teste de alta confiabilidade. Pode-se discutir desde qual soluto utilizar e a osmolaridade ideal da solução, até o número de células a serem contadas. Em estudos com sêmen de equinos verificou-se a existência

de correlação entre o HOST e outros parâmetros seminais, demonstrando que esse teste poderia ser utilizado como um teste preditivo de fertilidade (MELO; HENRY, 1999).

3.5.3 Utilização de sondas fluorescentes na avaliação espermática

O avanço nas biotécnicas aplicadas à andrologia tem oferecido novos métodos de avaliar a capacidade funcional de espermatozoides de diversas espécies (GARNER; JOHNSON, 1995). Dessa forma, o monitoramento da funcionalidade de organelas dos espermatozoides ou seus compartimentos têm sido realizados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente as sondas fluorescentes (CELEGHINI, 2005).

Segundo Celeghini et al. (2007), a funcionalidade e/ou a integridade das estruturas espermáticas são monitoradas pelas sondas fluorescentes ou fluoróforos, sondas que possuem características de ligação à pontos específicos das células, facilitando o diagnóstico. Assim, essa técnica é utilizada com sucesso entre as espécies, nas diferentes estruturas da célula espermática, podendo ser utilizada de forma isolada ou em associações nas espécies bovina (GARNER et al., 1997), equina (GRAVANCE, 2000), caprina (BATISTA et al., 2009) e ovina (SILVA et al., 2009b).

Essas diferentes afinidades das sondas fluorescentes por determinadas áreas do espermatozoide são determinadas pela interação das sondas com os lipídeos e proteínas distribuídas nas membranas (EDDY, 1994). Uma variedade de sondas fluorescentes tem sido usada isolada ou associada na andrologia, combinações das sondas fluorescentes possibilitam a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente. A associação de métodos e técnicas de coloração é uma prática necessária, visto que, alguns corantes são eficientes em sensibilizar determinadas estruturas da célula espermática e ineficientes em outras (VILLAVERDE et al., 2008).

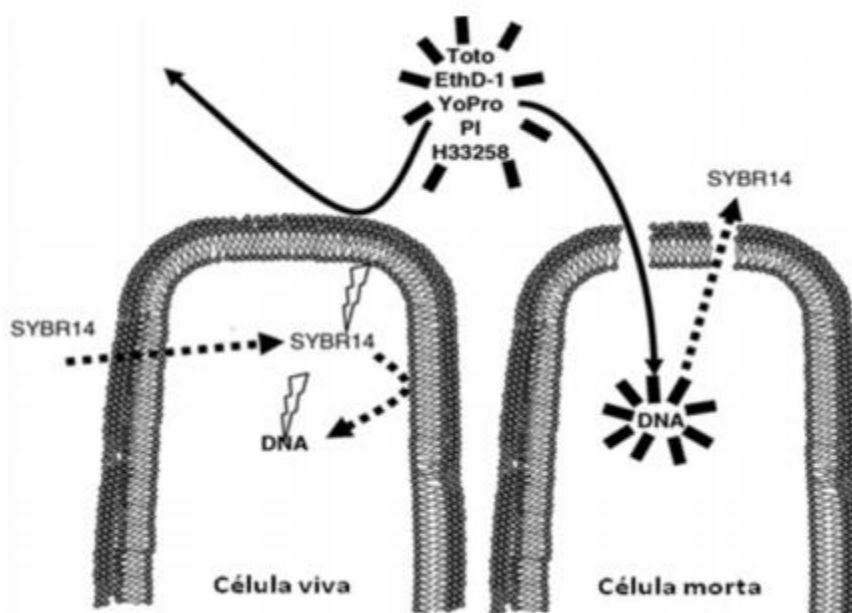
Portanto, microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo, quando utilizados com sondas de fluorescentes, pode avaliar: a integridade de membranas plasmática e acrossomal, o potencial mitocondrial, a translocação de fosfolipídios de membrana, o índice de caspase-ativada, o índice de fragmentação de DNA, a integridade do flagelo, a peroxidação lipídica, fosforilação da tirosina, reação acrossômica, entre outros (GARDES et al., 2010).

Sondas que possuem afinidade por endonucleases são utilizadas para avaliar a integridade da membrana plasmática, pois quando esta estrutura estiver lesada, a sonda

penetra e cora o núcleo, onde concentra-se o DNA (SILVA, 2010). Silva e Gadella (2006) listaram diferentes sondas supra vitais utilizadas com esta finalidade: Hoechst 33258, YoPro-1, Iodeto de Propídeo (IP), Etídio Homodimérico-1, ToPro-3 e TOTO.

Outra avaliação para integridade da membrana é com uso de sondas classificadas como anfipáticas, conseguem atravessar a membrana intacta e se ligar às esterases, identificando a célula viável, como quando se usa o Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e do SYBR-14® (Figura 3). Segundo Medina et al. (2000), o DCF é um éster não polar, não fluorescente, permeável à membrana plasmática que, dentro da célula é hidrolisado por esterases inespecíficas, resultando em um composto fluorescente e impermeável à membrana plasmática intacta que o adsorve e fluoresce em verde.

Figura 2. Esquema de ação de diferentes sondas utilizadas em testes de integridade de membrana plasmática

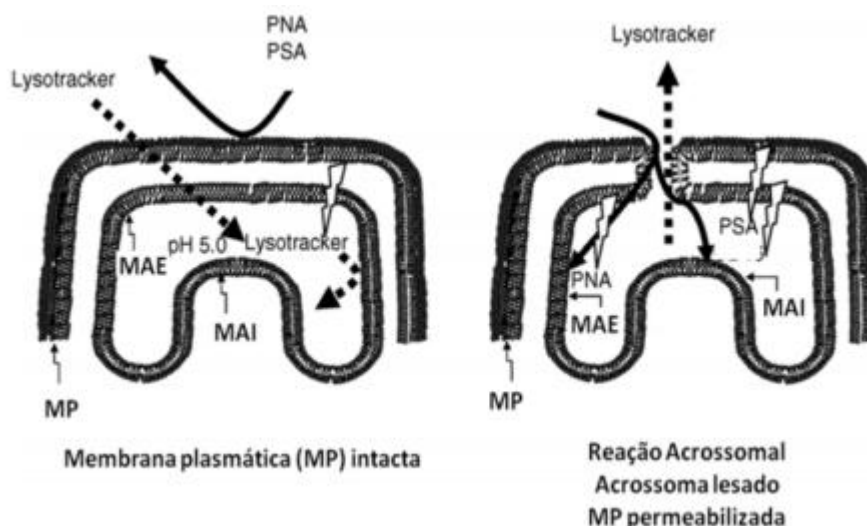


Fonte: Silva e Gadelha (2006).

Geralmente as sondas quando utilizadas são associadas com outras que tenha a afinidade pelo DNA, como o IP, esta junção promove resultados confiáveis na identificação de espermatozoides com membranas plasmáticas intactas, uma vez que a membrana preservada é corada de verde, pela ligação do DCF e a lesada cora a região nuclear em vermelho pela ligação do IP ao núcleo celular (COLETO et al., 2002).

Silva e Gadella (2006), em uma revisão sobre a avaliação da integridade do acrossoma, destacaram que as lectinas podem ser utilizadas, uma vez que são capazes de ligar-se a carboidratos existentes exclusivamente nas glicoproteínas da membrana acrossomal (Figura 4). Substâncias geralmente derivadas da ervilha da espécie *Pisum sativum* (PSA) e do amendoim da espécie *Arachis hypogaea* (PNA), assim como a Concanavalina A (ConA), uma lectina D-glucose/D-manose ligante extraída de sementes da forrageira *Canavalia ensiformis*, são associadas a fluoróforos, para permitir sua visualização ao microscópio de imunofluorescência, sendo mais utilizado o Isoticianato de Fluoresceína (FITC).

Figura 3. Esquema de ação das sondas fluorescentes nas membranas acrossomais externa (MAE) e interna (MAI)



Fonte: Silva e Gadella (2006).

As lectinas possuem locais de atuação diferente, a PNA apresenta afinidade pelos glicoconjugados da membrana acrossomal externa e as PSA e ConA liga-se à membrana acrossomal interna, mais especificamente aos grupos sacarídeos da glicoproteína pró-acrosina (HOLDEN et al., 1990).

As lectinas específicas que podem ser conjugadas são PNA-FITC, PNA-TRITC e o PNA-RPE. A observação é feita em células vivas; a ausência de fluorescência indica acrossoma intacto e a fluorescência indica ruptura do acrossomo ou reação acrossomal (SILVA; GADELLA, 2006). A coloração quando realizadas com FITC-PNA, apresenta três características que são detectados no espermatozoide ligado à zona pelúcida: 1)

fluorescência uniforme por toda a capa acrossomal, intenso; 2) variando em graus de mosqueado ou padrão irregular por toda a região acrossomal ou fluorescência apenas na região equatorial; 3) ausência de fluorescência. Caso complexo espermatozoide-hemizona seja permeabilizado antes da fixação, caracteriza como acrossomo intacto, acrossomo em reação e acrossomo reagido, respectivamente. (REGHINE, 2009). Desta forma, quando a membrana plasmática está intacta e foi utilizado as sondas de PSA e ConA, não vai ocorrer fluorescência. Entretanto, quando se tem lesão na membrana plasmática, observa-se fluorescência na região do acrossoma (SILVA; GADELLA, 2006).

As lectinas são proteínas que tem afinidade por carboidratos e têm sido marcadas com fluorescência para identificar a estrutura de superfície dos espermatozoides de mamíferos (CARDULO; FLORMAN, 1993). Várias lectinas são utilizadas para diferenciar células com acrossoma reagido daquelas com acrossoma intacto em particular as aglutininas derivadas do *Pisum sativum* (PSA), *Arachis hypogea* (PNA) e *Triticum vulgares* (WGA) (VALCARCEL et al., 1997). A vantagem de utilizar as lectinas é devida os custos baixos, sua comercialização é disponível e as células são marcadas em poucos minutos (CARDULO; FLORMAN, 1993).

3.6 Análise Objetiva do Sêmen

Durante a década de 1940, pesquisadores necessitavam obter dados objetivos na porcentagem de espermatozoides móveis e informações sobre a velocidade do movimento destas células. Diante disso, acreditava-se que fosse obtido dados precisos do movimento espermático seria possível prever o potencial de fertilidade de um macho ou selecionar o melhor procedimento para preparação do espermatozoide (AMANN; KATZ, 2004).

Lord Rothschild, ainda na década de 40, utilizou uma câmera fotográfica em tempo real, usando iluminação de campo escuro para identificar imagens da trajetória do movimento do espermatozoide e, manualmente, determinar a velocidade de deslocamento. Vários sistemas foram desenvolvidos na mesma época, porém incapazes de mensurar a velocidade individual das células. Em 1978 surgiu o primeiro sistema automático capaz de avaliar a trajetória do movimento espermático baseado na avaliação individual (VERSTEGEN et al., 2002).

A primeira comercialização do *Computer Assisted Sperm Analyzer* (CASA) especificamente para avaliação da motilidade espermática foi o CellSoft® (CRYO Resources, Montgomery, New York) comercializado por volta de 1985 utilizado em laboratório de pesquisa e laboratórios médicos (Mack et al., 1988). Em 1986, surgiu o Hamilton-Thorn Research (HTM 2000®, Beverly, Massachusetts), também desenvolvido especificamente para este tipo de análise (AMANN; KATZ, 2004).

Em 1992 surgiu o primeiro sistema integrado de computador e microscópio, o HTM-IVOS Sperm Analyzer®, permitindo a aquisição de imagens digitalizadas, proporcionando a classificação automática dos movimentos espermáticos, informando porcentagem de móveis, média de velocidade e porcentagem de progressivo. A HTM disponibiliza versões como HTM-IVOS 10® e HTM-CEROS 12.1®. A versão HTM-IVOS 10® faz avaliação do sêmen humano, mas já foi validado para outras espécies, como a canina. A versão HTM-CEROS 12.1® permite ainda avaliar morfologia e morfometria espermática (IGUER-OUADA; VERSTEGEN, 2001). O sistema proporciona quantificar um elevado número de células com padrão de motilidade heterogêneo em um curto período de tempo (FARREL et al., 1996), gerando dados de concentração de espermatozoides/mL, morfologia, motilidade e velocidade (KRAEMER et al., 1998).

Diante de todas as vantagens que o sistema oferece, ele apresenta algumas desvantagens que tornam seu uso limitado (VERSTEGEN et al., 2002), como o custo do equipamento e a necessidade de validação, o controle de qualidade e a padronização das avaliações realizadas (DAVIS; KATZ, 1993).

O CASA tem proporcionado nas pesquisas básicas resultados satisfatórios. O sistema tornou uma ferramenta útil no monitoramento da qualidade espermática de amostras submetidas a diferentes tratamentos experimentais (FARREL et al., 1996), pesquisa de novos diluidores seminais crioprotetores (AMANN; KATZ, 2004).

No CASA, a avaliação das características seminais é realizada pelo sistema estroboscópico controlado por computador. A vídeo-micrografia faz o acompanhamento constante e análise sequencial do movimento do espermatozoide (MORTIMER, 2000). A motilidade do espermatozoide é realizada pelo batimento flagelar, embora seja o flagelo a parte do espermatozoide que origina a motilidade, os sistemas automáticos

medem o movimento da cabeça, devido a uma maior facilidade em acompanhar esse movimento do que o flagelar (AMANN; KATZ, 2004).

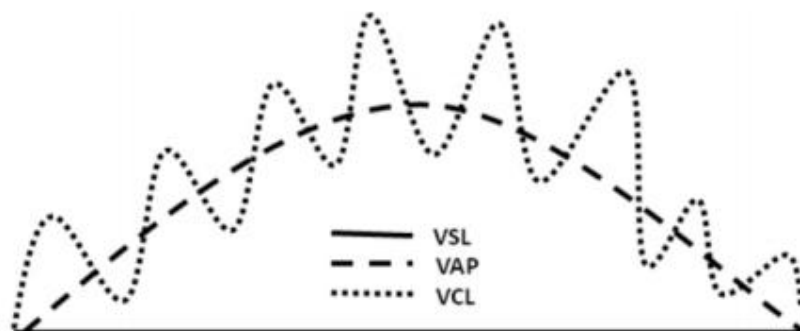
Devido a frequência do batimento flagelar ser muito elevada, acima de 80 batimentos por segundo em média, torna-se necessário, pelo menos, 200 observações por segundo para mensurar o padrão do batimento flagelar corretamente. Os sistemas atualmente avaliam 25-60 imagens por segundo, ou seja, usam uma menor frequência que a necessária para avaliação do batimento flagelar, impossibilitando a aquisição de boas imagens. A tecnologia de vídeo convencional é utilizada para obter imagens da movimentação de cabeça, devido a cabeça não se movimentar tão rapidamente como a cauda, o que possibilita a obtenção de imagens melhores (MORTIMER, 2000). As análises realizadas para a motilidade são através de uma câmera acoplada ao microscópio, que capta a imagem e converte para uma imagem digital, ou seja, essa sequência de imagem vai dar origem a um filme (DONALD et al., 1988).

O sistema padroniza o tamanho mínimo e máximo aceitável para a cabeça do espermatozoide de cada espécie, e o computador irá reconhecer um objeto que cair na faixa de tamanho de cabeça espermática pré-estabelecida. Partículas presentes na imagem com tamanho abaixo deste limiar serão considerados parte do fundo. Os padrões de espermatozoides móveis não progressivo, linear lento, linear rápido e imóvel são classificados após o *software* reconhecer a célula e desenhar seu filme. Em sequência, outras características são observadas e calculadas como a porcentagens de movimentos, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média do trajeto (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e índice de oscilação ou wobble (WOB). Estas referenciam a padronização do movimento espermático (MORTIMER, 2000).

Segundo Verstegen et al. (2002), os parâmetros reportados pelo CASA são a VCL, mensurada em micrômetros por segundo ($\mu\text{m/s}$), que é a velocidade da trajetória real do espermatozoide, geralmente a maior das três velocidades e serve como elemento de cálculo para a linearidade; A VSL ($\mu\text{m/s}$) é a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide, geralmente a mais baixa das três velocidades; a VAP ($\mu\text{m/s}$), que é a velocidade da trajetória média do espermatozoide, em casos onde a trajetória da cabeça espermática é muito regular e linear com pouco movimento lateral da cabeça, a VAP é quase a mesma

que a VSL, porém com trajetórias irregulares, não lineares ou onde existe um alto grau de movimento lateral, a VAP será maior que a VSL (FIGURA 4).

Figura 4. Representação gráfica dos parâmetros quantitativos expressos pelo sistema CASA em uma trajetória irregular



Velocidade Linear Progressiva (VSL); Velocidade Média do Trajeto (VAP);
Velocidade Curvilínea (VCL). Fonte: SILVA (2010).

A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), mensurada em micrometros (μm), é a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização; a frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), mensurada em Hertz (Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento (VERSTEGEN et al., 2002).

A linearidade (LIN) é a relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear > 0.7 , ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3° . Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade. A retilinearidade (STR) é a relação percentual entre VSL e VAP e estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta (Tabela 1) (MORTIMER, 2000).

Tabela 1. Velocidade qualitativa de espermatozoides avaliados pelo Sistema computadorizado de avaliação espermática

Parâmetros de Velocidades Qualitativas	
Parâmetros	Proporção de Velocidade
Linearidade (LIN)	$(VSL/VCL) \times 100$
Retilinearidade (STR)	$(VSL/VAP) \times 100$
Índice de Oscilação (WOB)	$(VAP/VCL) \times 100$

Fonte: Adaptado de Silva (2010).

Os valores de velocidade são determinados como percurso relevante percorrido em um período de tempo e são representados em $\mu\text{m/s}$, enquanto os valores de LIN e STR são determinados como raio dos valores de velocidade (AMANN; KATZ, 2004).

A hiperativação no espermatozoide é o processo que apresenta durante o seu avanço no oviduto da fêmea, descrito como um movimento vigoroso, não progressivo, não linear e está relacionado como processo de capacitação e fertilização (VERSTEGEN et al., 2002). No processo da hiperativação, o padrão e o vigor da trajetória do espermatozoide sofrem alteração, passando a ter uma larga amplitude do batimento flagelar, aumento médio do movimento lateral da cabeça e cauda do espermatozoide associados com uma motilidade rápida ou não progressiva de baixa frequência de batimento flagelar (KAY; ROBERTSON, 1998).

Através do CASA é possível avaliar a hiperatividade do espermatozoide a partir do uso de alta frequência. O uso de 60Hz permitiu melhor discriminação entre motilidade progressiva e motilidade hiperativada quando comparada a análises feitas a 30Hz (CANCEL et al., 2000). Espermatozoide hiperativado é aquele que apresenta: $VCL \geq 70\mu\text{m/s}$, $ALH \geq 7\mu\text{m}$, $LIN \leq 30\%$ e $VSL \leq 30 \mu\text{m/s}$, observado em sêmen (VERSTEGEN et al., 2002).

Nos últimos anos, o CASA tem mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades do espermatozoide de forma individual do ejaculado, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho (COX et al., 2006). Na tentativa de correlacionar os parâmetros do CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras com mais de 50% de oócitos fertilizados (VERSTEGEN et al., 2002). Os parâmetros de velocidade de LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical

(MORTIMER, 2000). Entretanto, entre os parâmetros cinéticos fornecidos pelo sistema CASA, a VCL e a ALH têm mostrado grande relação com taxa de fertilização. Segundo VERSTEGEN et al. (2002), os parâmetros BCF e LIN têm correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos, mas correlação negativa em outros estudos.

Espermatozoides humanos que apresentaram boa penetração no muco cervical apresentam um grupo de propriedades cinemáticas semelhantes a: $VAP = 25\mu\text{m/s}$ e $ALH = 4,5\mu\text{m}$ (MORTIMER, 2000) enquanto, em caprinos, espermatozoides com velocidade eficiente na migração do muco cervical *in vitro* apresentam $LIN >50\%$ e $ALH = 4,8\mu\text{m}$ (COX et al., 2006).

Sabe-se que a qualidade da motilidade e a morfologia espermática estão associadas à capacidade de fertilização (HOLT, 2000), entretanto, esta hipótese possuem uma correlação absoluta, ou seja, o parâmetro da motilidade é menos preciso do que a real fertilidade das amostras de sêmen para se estimar a viabilidade espermática (CARVALHO; PAPA, 2003). Desta forma, JASKO (1992) verificou que a motilidade total, progressiva e velocidade média (VAP) podem prever melhor sobre a fertilidade, demonstrando a importância do uso da análise computadorizada para se obter uma maior acuidade nas avaliações.

3.7 Ultrassonografia Doppler

3.7.1 Princípios físicos da ultrassonografia

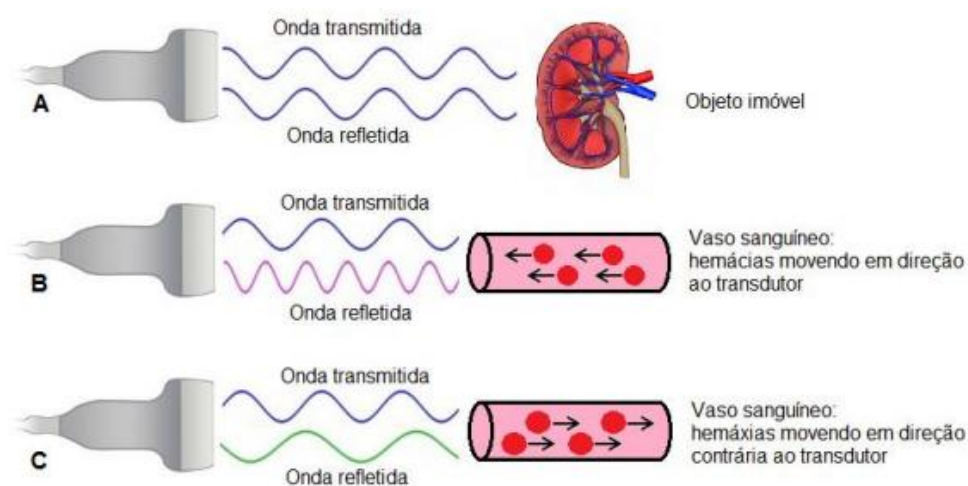
A onda produzida pela ultrassonografia é uma energia acústica, gerada quando vários cristais piezoelétricos vibram a uma frequência elevada, em resposta a uma corrente alternada (ALDRICH, 2007), essa vibração gera pulsos de energia que são emitidos pelo transdutor que se refletem no organismo e voltam ao transdutor contendo informações a respeito da amplitude e frequência da onda sonora (MERRITT, 1999).

Na ultrassonografia convencional quanto mais elevado os pulsos transmitidos, maiores serão os retornos do eco, gerando imagens variações de tons de cinza (NYLAND; MATTOON, 2004). Quando os ecos choram com partículas que apresentam movimento rápido, como as hemácias, produzem ecos de baixa amplitude, promovendo imagens anecoico dentro da luz dos vasos sanguíneos (MERRITT, 1999).

Quando o eco de alta frequência choca com um objeto imóvel, o som refletido

tem a mesma frequência ou o mesmo comprimento de onda do som transmitido. Entretanto, alvos em movimento com relação ao feixe sonoro emitido pelo transdutor ocorrem uma mudança na frequência do som que se dispersa pelo objeto em movimento (Figura 5). Mudanças destas frequências atuam na velocidade da interface refletora com relação ao transdutor, resultando no efeito Doppler (CARVALHO et al., 2008b).

Figura 5. Variação das ondas sonoras transmitidas e emitidas pelo transdutor em: A - objeto imóvel - a onda é refletida com mesma frequência que foi emitida, B – objeto com movimento em direção ao transdutor – a onda reflete com frequência maior que a emitida, C – objeto com movimento em direção contrária ao transdutor – a onda refletida com frequência é menor que a emitida



Fonte: adaptado de Carvalho (2009).

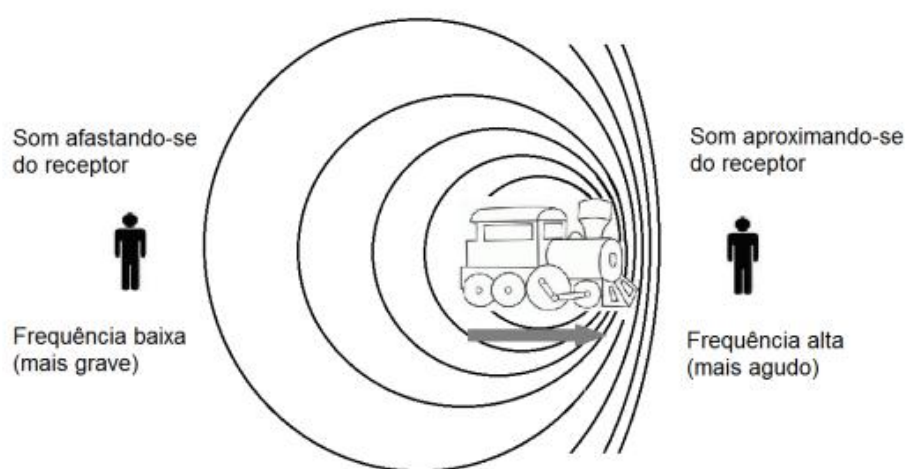
3.7.2 Histórico e efeito Doppler

Em 1842, Christian Johann Doppler descreveu a situação na qual uma fonte de ondas (sonoras ou eletromagnéticas), que está em movimento em relação a um receptor, altera a frequência de onda durante este processo, aumentando a frequência durante a aproximação da fonte e diminuindo durante o seu distanciamento. Assim, na ultrassonografia, o chamado efeito Doppler pode ser definido como sendo o princípio físico no qual se verifica a alteração da frequência das ondas refletidas quando o objeto (corpo) reflete se move em relação a uma fonte de onda sonora (KAWAKAMA et al., 1993).

Quando nos referimos a um som audível, o efeito Doppler é um fenômeno

natural observado em nosso cotidiano, como por exemplo, a buzina de um carro em movimento em relação a uma pessoa parada (FIGURA 6). O efeito Doppler vem do princípio da frequência Doppler, que é a diferença entre a frequência de ecos recebidos e ecos emitidos pelo transdutor sendo o referencial estático o transdutor, e a hemácia o objeto em movimento que irá gerar a diferença entre a frequência de ecos emitidos e recebidos (GINTHER; UTT, 2004).

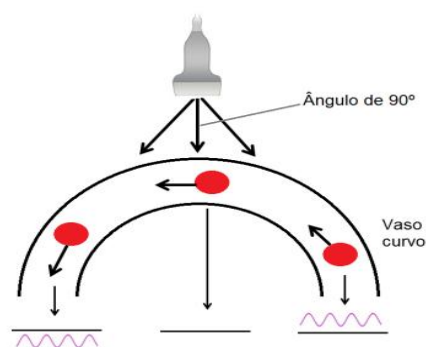
Figura 6. Representação do efeito Doppler: O apito do trem tem alteração na frequência em relação à aproximação ou afastamento do receptor



Fonte: Adaptada de Carvalho (2009).

O ângulo entre a intersecção do movimento das células sanguíneas e eco emitido pelo transdutor é denominado ângulo Doppler ou ângulo de insonação. Os gráficos de valores das velocidades do fluxo sanguíneo só serão confiáveis quando este ângulo estiver entre 30 e 60 graus (FIGURA 7), durante o exame Doppler-espectral (GINTHER; UTT, 2004).

Figura 7. Efeito do ângulo de insonação e a curva resultante do espectral Doppler em um vaso, na posição de perpendicularidade (90°) ocorre ausência de sinal



Fonte: Adaptado de Carvalho (2009).

3.7.3 Fundamento do Doppler

As técnicas apresentam diferentes modos de ação e são definidas de acordo com o objeto de interesse: o modo Doppler-espectral e o modo Doppler-colorido. (CARVALHO, 2009). O modo Doppler-espectral é utilizado para avaliação das velocidades, pulsatilidade e resistência do fluxo sanguíneo. Transmite pulsos em intervalos regulares e recebe o sinal refletido no resto do tempo, comparando-o com aquele transmitido. A onda pulsada permite ao Doppler medir uma região específica dentro de um campo de imagem, possibilitando assim a medida da velocidade dentro dos vasos selecionados (COLTRERA, 2010).

A amostra a ser avaliada é guiada por um cursor retangular móvel, ajustável pelo operador, os ecos originados do sangue em movimento atingem o transdutor captando o eco. Entretanto o cursor deve estar inteiramente posicionado sobre o lúmen do vaso sanguíneo, para produção do gráfico espectral (CARVALHO, 2009) (Figura 8).

Nos últimos tempos, a ultrassonografia tem ferramentas que podem possibilitar o mapeamento colorido do fluxo sanguíneo como o modo Doppler-colorido, é utilizado para identificar e analisar estruturas ou órgãos permitindo uma avaliação geral da perfusão sanguínea, o deslocamento de frequência Doppler é demonstrado como um espectro de uma ou duas cores dentro de uma área definida (caixa colorida) (CARVALHO et al., 2008). Doppler colorido possibilita ser utilizado associado ao Doppler espectral, denominado triplex Doppler, promovendo informações complementares que possibilitam uma maior acurácia no diagnóstico (KING, 2006).

A função Power-Flow, permite uma avaliação mais detalhada dos vasos sanguíneos de menor calibre, baixo fluxo e maior sensibilidade (GINTHER, 2004). Já a função Color-Flow é responsável por identificar a perfusão vascular em cores azul e vermelho, sendo baseado com a relação do fluxo sanguíneo com o transdutor (GINTHER, 2007).

Figura 8. Imagem ultrassonográfica Doppler – modo espectral. Forma de onda da velocidade do fluxo sanguíneo durante um ciclo cardíaco



Doppler Parâmetros de velocidade: PSV, velocidade sistólica de pico; EDV, final diastólico velocidade; TAMV, velocidade máxima média de tempo Fonte: ortiz-rodriguez (2014).

O pico sistólico (PSV) em modo espectral é o ponto mais elevado no traçado do gráfico, já o pico diastólico final (EDV) representa o ponto mais baixo da onda, anterior ao início da próxima onda. A velocidade máxima média (TAMV) é gerada pelo cálculo da média de todas as velocidades máximas dividida pelo tempo de duração do ciclo (GINTHER, 2007).

Os índices Doppler são uma forma de minimizar os erros de mensuração das velocidades do fluxo sanguíneo (GINTHER, 2004). Os índices de resistência (RI) e pulsatilidade (PI) são gerados pela equação $[(PSV - EDV) / PSV]$ e $[(PSV - EDV) / TAMV]$, respectivamente. São especialmente utilizados na mensuração de fluxo sanguíneo de vasos de pequeno calibre e tortuosos (ORTIZ-RODRIGUES et al., 2017).

REFERÊNCIAS

- ABOU-HAILA, A.; TULSIANI, D. R. P. Mammalian sperm acrosome: formation contents and function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 2, p. 173-182, 2000.
- ALDRICH, J. E. Basic physics of ultrasound imaging. **Critical Care Medicine**, **Baltimore**, v. 35, n. 5, p. 131-137, 2007.
- AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O. V., J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, v. 80, p.717-718, 1993.
- AMANN, R. P.; JOHNSON, L.; PICKETT, B. W. Connection between the seminiferous tubules and the efferent ducts in the stallion. **Animal Journal Veterinary Research**, v. 38 (10), p. 1571- 1579, 1977.
- AMANN, R. P.; KATZ, D. F. Reflections on CASA after 25 years. **Journal Andrology**, v.25, p.317-325, 2004.
- AMANN, R. P.; MCKINNOM, A. O.; VOSS, J. L. Physiology and Endocrinology. **Equine Reproduction**, p. 881- 908, 2011.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B .D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57(2), p. 380-403, 1983.
- AZEVEDO, M. V.; Avaliação Ultrassonográfica Doppler da Vascularização Ovariana de Éguas Submetidas à Dupla Ovulação. (Tese). (Doutorado em Ciência Veterinária). **Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife, 2015.
- BATISTA, A.M.; SILVA, S.V.; SOARES, A.T. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais...**, Belo Horizonte: CBRA, p. 409, 2009.
- CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 93-99, 2008.
- CANCEL A, LOBDELL D, MENDOLO P, PERREAULT D. Objective avaliation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, v.15, p.1322-1328, 2000.
- CARVALHO, G. A. Efeito de diferentes diluidores sobre viabilidade espermática, utilizando-se diversas formas de refrigeração com sêmen equino. 2003. 138f.

Dissertação (Mestrado) – **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**, Botucatu, 2003.

CARVALHO C. F., CHAMMAS M. C., CERRI G. G. Princípios físicos do Doppler em ultrassonografia. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 3, p. 872-879, 2008.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A, N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. Pesquisa. **Agropecuária. Brasileira**, v.44, n.10, p.1346-1351, 2009.

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 20. ed. Uberlândia-MG, CBRA, 2013. www.cbra.org.br, acesso em abril de 2017.

CELEGHINI, E. C. C. Uso de CMXRos e JC-1 na avaliação da função mitocondrial, associadas a sondas fluorescentes para avaliação da membrana plasmática e acrossomal em espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**, v. 33, p. 321, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007.

CHENIER, T. S. Anatomy and Physical Examination of the Stallion. **Philadelphia: Saunders Elsevier**, v. 2, p. 1-25, 2000.

CORREIA, A. A. D.; CORREIA, J. H. R. D. **Bioquímica animal**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 1223, 1985.

COLTRERA, M. D. Ultrasound physics in a Nutshell. **Otolaryngologic Clinics of North America, Philadelphia**, v. 43, n. 6, p. 1149–1159, 2010.

COX, J. F.; ALVARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer assisted analyses of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v. 66, p. 860-967, 2006.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Operational standards for CASA instruments. **Journal Andrology**, v. 14, p.385-395, 1993

DONALD, T. S.; HICKMAN, R.; HOSKINS, D. D. Description, validation and performance characteristic of a new computer-automated sperm motility analysis system. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 577-586, 1988.

DOTT, H. M.; FOSTER, G. C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'live/dead' stain. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.29, p. 443-445, 1972.

DREVIUS, L. O. The permeability of bull spermatozoa to water, polyhydric alcohols and univalent anions and the effects of the anions upon the kinetic activity of spermatozoa and sperm models. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, p. 41-54, 1972.

FARREL, P. B.; FOOTE, R. N.; MCARDLE, M.M.; TROUERN-TREND, V. L.; TARDIF, A. L. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, p.293-300, 1996.

FILHO, F. O. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. **Assessoria de Comunicação e Eventos**, p. 7, 2016.

GADELLA, B.M. Sperm membrane Physiology and Relevance for Fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARNER, D. L. Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1401-1406, 1997.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v.53, p.276-284, 1995.

GETTY, R. Osteologia do carnívoro. In: GETTY, R. (Ed.). Sisson/Grossman **Anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 1337-1412. 2008.

GINTHER, O. J.; UTT, M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 24, p. 516-526, 2004.

GINTHER, O. J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Color Doppler Ultrasonography. Book 4 **Equiservices Publishing**, Cross Plains, WI, USA-2017.

GRAVANCE, C. G. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S. A. F. **Cavalo: velocidade de R\$ 7,3 bi por ano**. São Paulo. 2006. Disponível em: <<http://www.agroanalysis.com.br/>>. Acesso em: 27 jan. 2016.

- HAMMES, A. M.; PIMENTEL, C. A.; FERNANDES, C. E. Fertilidades em garanhões avaliadas através do exame andrológico. **Ciência Rural**, v. 26, p. 277-283, 1996.
- HOLDEN, C.A.; HYNE, R.V.; SATHANANTHAN, A.H. et al. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, n. 3, p. 247-257, 1990.
- HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 3-22, 2000.
- IGUER-OUADA M, VERSTEGEN J. Evaluation of the Hamilton-Thorn computer based automated system for dog semen analysis. **Theriogenology**, v. 55, p. 733-749, 2001.
- JASKO, D. J.; Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America – Equine Practice**, v. 8, p. 129-148. 1992.
- JEYENDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZPELAEZ, M.; CRABO, B. G.; ZANEVELD, L. J. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal Reproduction Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.
- JOHNSON, L., THOMPSON JR., D.L. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 81, p. 227–232. 1987.
- KAY, V. J.; ROBERTSON, L. Hyperactivated motility of human spermatozoa: a review of physiological functions and application in assisted reproduction. **Human Reproduction**, v. 4, p. 776-786, 1998.
- KING, A. M. Development, advances and application of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**, London, v. 3, n. 171, p. 408-420, 2006.
- KRAEMER, M.; FILLION, C.; MARTIN-PONT, B.; AUGER, J. Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. **Human Reproduction**, v. 13, p. 611-619, 1998.
- LEBOUEF, B.; LE VERN, Y.; FURSTOSS, V.; KERBOEUF, D.; GUILLOUET, P.; MAGISTRINI, M. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modeled probit analysis. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 265-274, 2006.

- McKINNIN, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction. Philadelphia**, v.2, p. 27-57, 1993.
- MEDINA, V. H.; VICENTE, W. R. R.; ESPER, C. R. et al. Uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides ovinos antes e após congelamento. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, p. 204-209, 2000.
- MERRITT, C. R. B. Física do Ultra-som. In: RUMACK, C. M.; WILSON, S. R.; CHARBONEAU, J. W. **Tratado de ultra-sonografia diagnóstica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 2, p. 3-29. 1999.
- MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial**. Porto Alegre: Sulina, v.5 p. 344, 1982.
- MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **Journal Andrology**, p.515-524, 2000
- NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. **São Paulo: Roca**, v. 2, p. 1-20, 2004.
- NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. **2ª ed. São Paulo: Roca**, p. 506, 2005
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 20, p. 289-318, 2001.
- PANG, S. F.; LI, L.; AYRE, E.; LEE, P. P. N.; XU, R. K.; CHOW, P. H.; YU, Z. N.; SHIU, S. Y. W. Neuroendocrinology of Melatonin in Reproduction: Recent Developments. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 14, p. 157-166, 1998.
- PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. DELL, AQUA JR, J. A.; MONTEIRO, G. A. **Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen Equino**, p. 19, 2011.
- SAMPER, J. C.; **Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Philadelphia: Saunders Elsevier**, p. 306, 2000.
- SETCHELL, B.P. The effects of heat on the testes of mammals. **Animal Reproduction**, v.3, p. 81-91, 2006.
- SILVA, K.M.G.; MORAES, T.A.P.; SILVA, E.C.B.; et al. Efeito da adição de trolox e pentoxifilina na motilidade, integridade do acrossoma e do DNA de espermatozoides equinos após descongelamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 42-49, 2009.
- SILVA, P.N.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006.

- SILVA, V. S.; Avaliação de Espermatozoides Ovinos Criopreservados em Tris-Gema Acrescido de Antioxidantes Enzimáticos e não-enzimáticos (Tese) (Doutorado em Ciência Veterinária). **Universidade Federal Rural de Pernambuco**. Recife, 2010.
- STANBENFELDT, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. Fisiologia dos animais domésticos. **Guanabara Koogan S. A**, v.35, p. 603- 614, 1996.
- TAKAHASHI, K.; UCHIDA. A.; KITAO, M. Hypoosmotic swelling test of sperm. **Archives of Andrology**, v.25, p.225-242, 1990.
- VALLE, G. R.; SILVA FILHO, J. M. Membrana plasmática do espermatozóide. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**, v. 36, p. 45-53, 2001.
- VALCÁRCEL, A.; HERAS, M. A.; PÉREZ, L.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. Assessment of acrossomal status of membrane- intact ram spermatozoa after freezing and thawing, by simultaneous lectin/Hoechst 33258 staining. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 299-309, 1997.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in Andrology Research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.
- VIECELLI, C. F.; MARTINS, W. P.; GALLARRETA, F. M. P.; BARRA, D. A.; FERREIRA, C; A.; FERREIRA, A. C.; MAUAD FILHO, F. Ultrassonografia Doppler em ginecologia. **Femina**, v. 36, p. 497-503, 2008.
- VILLAVERDE, A. I. S. B.; MELO, C. M.; CORRENTE, J. E. Comparação entre dois métodos de coloração para análise morfológica e acrossomal de espermatozoides de gato doméstico (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 9, p. 686-692, 2008.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico elaborado segundo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ANEXO A).

CAPITULO I

Impacto da Ultrassonografia Doppler no Diagnóstico de Subfertilidade de Equinos Criados no Estado da Paraíba

Impact of Doppler Ultrasonography on the Diagnosis of Subfertility of Equine Breeds
in the State of Paraíba

Allan Gledson Ferreira dos Santos^{1,2*}, Hugo Albino Braz³, Robespierre Augusto
Joaquim Araújo Silva⁴, Maria Madalena Pessoa Guerra⁴, Marlon de Vasconcelos
Azevedo³, Sildivane Valcácia Silva^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB, Brasil; ² Laboratório de Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA), Centro de Biotecnologia (CBiotec), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil; ³ Médico Veterinário Autônomo; ⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (PGCAT), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Dois Irmãos, Recife-PE. allan_g_santos@hotmail.com

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho avaliar a ultrassonografia Doppler com o exame clínico-andrológico identificando a fertilidade dos equinos no estado da Paraíba. Foram utilizados 11 equinos da raça quarto de milha, com idade entre três a 27 anos. Os ejaculados foram colhidos pelo método de vagina artificial e as amostras foram submetidas à avaliação de cinéticas espermática a campo e pelo sistema informatizado para análise de espermatozoide (CASA). Em seguida os animais foram submetidos a avaliação do fluxo sanguíneo testicular com a ultrassonografia Doppler. Diferenças significativas ($P < 0,05$) foram observadas entre os parâmetros de motilidade subjetiva, avaliada a campo, e motilidade total avaliada no CASA. Avaliação da membrana espermática eosina-nigrosina foi semelhante ao teste das sondas de fluorescência. Animais idosos apresentam motilidade reduzida seguidos de um menor aporte sanguíneo na região testicular e baixa fertilidade. A ultrassonografia Doppler identificou com o Índice de Pulsatilidade tem correlação positiva com amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) do espermatozoide. Conclui-se que exame clínico-andrológico, quando isolado, não determinar a capacidade fértil de garanhões; a ultrassonografia associada ao método Doppler identifica animais subfêrteis e pode ser uma ferramenta auxiliar na seleção de reprodutores equinos com potencial fertilidade.

Palavras-chave: fertilidade; índice de resistência; membranas espermáticas.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the Doppler ultrasonography with the clinical-andrological examination and fertility of horses in the state of Paraíba. Eleven quarter horse equine animals, aged between three to 27 years, were used in this experiment. The ejaculates were collected by the artificial vagina method and the samples were submitted to field sperm kinetics and by Computer Assisted Sperm Analyzes (CASA). Afterwards, the animals were submitted to evaluation of testicular blood flow with Doppler ultrasonography. It was observed statistical differences ($p < 0.05$) between the parameters of subjective motility evaluated in the field and in the CASA. Evaluation of sperm membrane integrity in the field was similar to the fluorescence test. Older animals have reduced motility followed by a lower blood supply in the testicular region and low fertility. The Doppler ultrasonography identified that the Pulsatility Index has a positive correlation with the amplitude of the lateral displacement of the head (ALH) of the spermatozoid. It is concluded that the clinical-andrological examination, when isolated, does not determine the fertile capacity of stallions; ultrasound associated with the Doppler method identifies subfertile animals and may be an auxiliary tool in the selection of equine reproducers with potential fertility.

Keyword: fertility; resistance index; sperm motility.

Introdução

O complexo do agronegócio equino no Brasil é uma atividade que movimenta anualmente R\$ 16,15 bilhões e gera 612 mil empregos diretos, sendo responsável por desenvolver cerca de 3 milhões de postos de trabalho de forma indireta (OBINO FILHO, 2016).

Destacam-se também no agronegócio equino os vários fornecedores de insumos, produtos, serviços para a criação, como medicamentos, rações, selas, acessórios, ferrageamento, veterinários, treinadores, transporte de equinos, ensino e pesquisa (AZEVEDO, 2015).

A partir da segunda metade do século XX, destacam-se a introdução do cavalo no aspecto social, nas atividades de esportes e lazer, na equoterapia auxiliando no

tratamento de portadores de dificuldades na área cognitiva, psicomotora e sócio afetiva (LIMA et al., 2006).

O Nordeste é o principal impulsionador deste desenvolvimento devido ao esporte da vaquejada, reunindo cerca de 600 animais em apenas uma única prova final de semana, este esporte provém da cultura sertaneja nordestina, como grande manifestação popular (AZEVEDO, 2015).

A importância econômica de um reprodutor da espécie equina é fundamental dentro da equinocultura brasileira, pois muitos animais de alto valor zootécnico são exigidos ao extremo durante repetidas estações de monta pelo alto valor de suas coberturas. Portanto, falhas na fertilidade destes garanhões esportistas acarretarão prejuízos econômicos consideráveis (HAMMES et al., 1996).

De acordo com Ginther (1992), a espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. Nesse aspecto é válido ressaltar a relevância do garanhão na reprodução equina, sendo ele o responsável por produzir um grande número de produtos por ano. Através de um único ejaculado pode fecundar várias éguas quando utilizadas modernas biotecnologias.

Desta forma, o exame andrológico passa a ser uma ferramenta de grande importância na comercialização de coberturas e garanhões, já que nas outras espécies domésticas, com raras as exceções, não são selecionadas pelo seu desempenho reprodutivo, e sim pelo seu pedigree, desempenho esportivo e outras características.

O exame do potencial de fertilidade de um garanhão inclui todas as etapas de um exame andrológico, e é indicado antes de iniciar a estação de monta, exposição, diagnósticos de sub ou infertilidade, ocorrência da puberdade, destinado a criopreservação de sêmen e comercialização (PAPA et al., 2011).

O exame andrológico é uma forma indireta de avaliar a fertilidade de garanhões. As principais causas de infertilidade equina são variadas, como cópula mal realizada, agentes patológicos e problemas na qualidade espermática. Cavalos que apresentam alterações no seu comportamento sexual devem ter uma atenção redobrada; levando em consideração o exame do sêmen, o que se objetiva é avaliação indireta, como a quantidade, qualidade, forma de armazenamento e o transporte no trato genital masculino.

Baseado na importância do mercado do cavalo e a identificação do crescimento deste setor, este trabalho objetivou avaliar a relação do exame andrológico, estudos ultrassonográficos e a fertilidade em equinos garanhões criados no estado da Paraíba.

Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido em parceria com os laboratórios de Reprodução Animal do Centro de Ciências Veterinária (UFPB/Campus II/Areia), Biotecnologia em Reprodução Animal (LABRA/CBiotec/UFPB/Campus I), Laboratório de Andrologia (ANDROLAB/Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE/Campus Dois Irmãos) e os dados coletados na região de Campina Grande/PB (7° 15' 18" de latitude sul e 35° 55' 28" de longitude oeste), no período entre outubro de 2016 a outubro de 2017. As condições edafoclimáticas locais apresentam temperaturas mais moderadas, considerado tropical com estação seca, com chuvas concentradas no outono e inverno, principalmente entre os meses de abril e julho, sendo este último o mês de maior precipitação, com média de 154 milímetros (AESA, 2017).

Os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba (Protocolo 124/2016 CEUA/UFPB). Onze equinos da raça quarto de milha, com idade entre três a 27 anos e histórico de fertilidade foram utilizados. Os animais foram alimentados com concentrado (6 kg/animal/dia), água e feno tifton *ad libitum*. Os animais foram mantidos nas fazendas de criação.

Foram realizadas duas colheitas de sêmen por animal. Os ejaculados foram colhidos pelo método de vagina artificial modelo Hannover, com temperatura média de 37 °C. A vagina foi revestida por uma camisinha sanitária e copo coletor composto por filtro de nylon para remoção da fração gel do ejaculado. Utilizou-se para a colheita um manequim natural, uma égua em estro, os garanhões eram condicionados para a realização da coleta. Após a colheita do sêmen, o ejaculado foi mantido fora da luz, sobre placa aquecedora (37 °C) durante a avaliação. O sêmen fresco foi avaliado quanto ao volume e aspecto no próprio copo coletor graduado.

A estimativa da motilidade foi realizada por avaliação subjetiva expressa em porcentagem (0-100%), segundo o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). As amostras de sêmen receberam diluição de 1:1 com diluente comercial, (Botu-

sêmen, base de leite desnatado, Botufarma, Brasil) e armazenado (BotuIA, tubo plástico, Botufarma, Brasil). Logo em seguida, foram condicionadas na caixa de transporte (BotuFlex, Caixa Isotérmica, Botufarma, Brasil). Os ejaculados foram transportados para o ANDROLAB, com percurso médio de três horas. A concentração espermática seguiu as normas do CBRA (2013).

Para o teste de integridade de membrana plasmática foi empregada dupla coloração com os corantes eosina-nigrosina, segundo o CBRA (2013). O teste hiposmótico foi realizado segundo Snoeck et al. (2014).

A avaliação da cinética espermática foi realizada através do sistema informatizado para análise de espermatozoide (CASA, SCA; Microptics, SL, Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Uma alíquota (5 μ L) de amostra foi colocada sobre lâmina e lamínula (18x18 mm); ambas pré-aquecidos a 37 °C e avaliada por microscopia de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão). As imagens das células espermáticas foram capturadas usando uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologie A312FC, Ahrensburg, Alemanha), ampliação de 100x. Para cada amostra, foram gravados cinco campos aleatórios, não consecutivos, com observação mínima de 500 espermatozoides por captação. As seguintes variáveis foram avaliadas: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade linear progressiva (VSL; μ m/s), velocidade curvilínea (VCL; μ m/s), velocidade média do percurso (VAP; μ m/s), Frequência do batimento flagelar cruzado (BCF; Hz), amplitude do deslocamento lateral de canbêça (ALH; μ m), retilinearidade (STR; %) e linearidade (LIN; %). Os parâmetros do sistema CASA foram medidos com as seguintes configurações: temperatura de 37 °C; ampliação 100 x; número de imagens, 25; quadros por segundo, 25; área da cabeça, 20-70 μ m²; VAP: 10 μ m/s lentos; <45 μ m/s médio; <75 μ m/s rápidos; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN e índice de oscilação (W.O.B).

Para análise da integridade de membrana plasmática e acrossomal (iPAM), 50 μ L do sêmen foi corado com 5,0 μ L de IP (solução de trabalho: 1 mg/mL em PBS) e 5,0 μ L de FITC-PNA (solução de trabalho: 0,04 mg/mL em PBS), homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por cinco minutos e avaliada por meio de citometria de fluxo. Para tanto, foi utilizado citômetro de fluxo ImageStream x Mark II (EMD Millipore Corp., Seattle, Washington) equipado com um microscópio com objetiva 60x

(resolução de pixel de 0,5 μm) com uma taxa de imagem de 5000 células por segundo, e velocidade de fluxo de 44 mm/s. O laser 488 nm foi utilizado com intensidade ajustada para 55,0 mW. O tamanho das células foi de 7,0 μm , as quais foram avaliadas em laser 488 nm, com intensidade ajustada para 55,0 mW. Um total de 5000 eventos por amostra foi capturado. Imagem de campo brilhante foi coletada usando um iluminador de campo brilhante baseado em LED. Células marcadas com FITC-PNA foram coletadas no canal 2 (505-560 nm), e marcadas com o IP foram recolhidas no canal 5 (640-745 nm). O software INSPIRE foi usado, e a análise da imagem foi realizado usando o software de análise de imagem IDEAS 6.0. Os resultados obtidos foram expressos como percentual de células com membrana plasmática intactas (PNA-/IP-).

Para o exame ultrassonográfico, os animais foram posicionados no tronco de contenção para equinos e submetidos ao exame na região do testículo e cordão espermático. Utilizou-se o aparelho S2V (SonoScape Co., Ltda, China), equipado com transdutor linear e convexo, ambos multifrequencial.

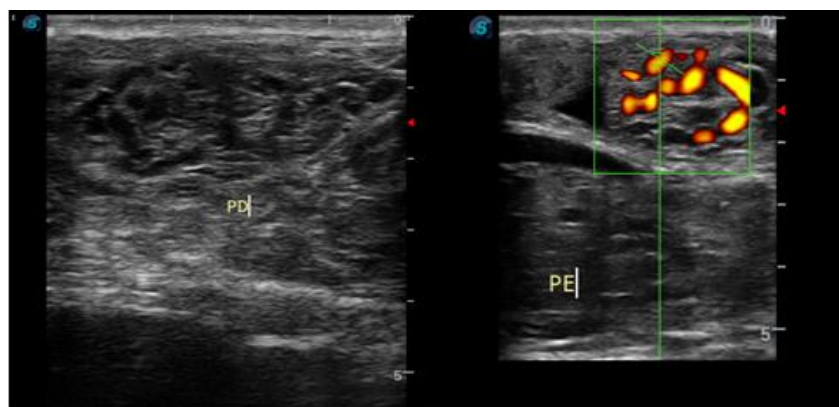
Antes do exame de ultrassonografia, os animais passaram por exame clínico para avaliação da frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura corporal, tempo de perfusão capilar (TPC), motilidade intestinal e colheita de sangue para análise hematológica. Todos os exames de ultrassonografia foram realizados pelo mesmo operador, para evitar variação operacional.

Inicialmente o modo B identificou artérias testiculares (Fig. 1A) e posicionou o modo Power Doppler para a avaliação dos parâmetros de fluxo sanguíneo (Fig. 1B). Em seguida, o Doppler pulsátil avaliou a velocidade do fluxo sanguíneo dos vasos (Fig. 2A e 2B), com utilização do ângulo Doppler de 60°. Para avaliação dos parâmetros Doppler foi calculado a Velocidade Sistólica do Pico (PSV), a Velocidade Diastólica Final (EDV) e a Velocidade Máxima do Tempo (TAMV); estes valores foram utilizados para o cálculo dos Índices de Resistência (IR: PSV-EDV/PSV) e Pulsatilidade (IP: PSV-EDV/TAMV).

Durante a estação de monta os garanhões foram submetidos a colheitas de sêmen entre uma a três coletas por semana; cada garanhão foi utilizado para a inseminação de éguas, de acordo com a demanda, ocasionando um número variável de éguas inseminadas durante toda estação de monta para cada reprodutor. O percentual de fertilidade foi calculado baseado em éguas prenhes com uma única inseminação.

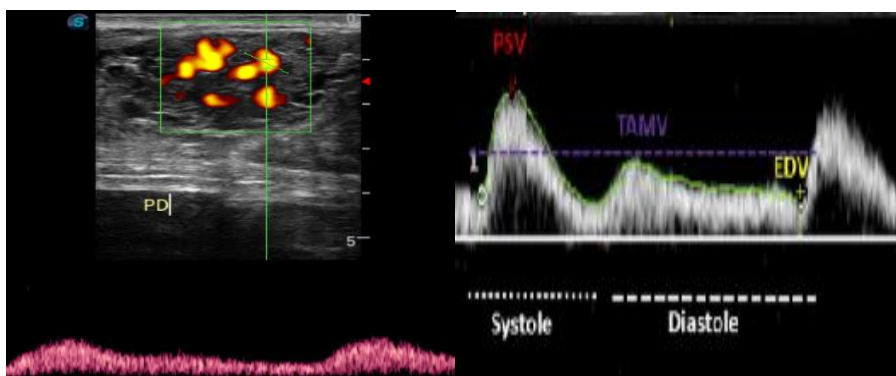
Para análise dos dados, o experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste R Core Team (2017) devido os dados serem classificados como não paramétricos. Após os resultados, foi realizada uma análise de regressão exponencial e teste de correlação Pearson. Foi utilizado o software R versão 3.4 para a realização das imagens.

Figura 1. Imagem ultrassonográfica da artéria testicular em Modo B (A); Posicionamento do Modo Power Doppler no cordão espermático (B)



Plexo Direito (PD); Plexo Esquerdo (PE). Fonte: Arquivo Pessoal.

Figura 2. Corte transversal do cordão espermático. A. Modo Power Doppler de cor dos vasos do cordão espermático, exibição do método utilizado para medir um ciclo cardíaco usando Doppler pulsátil

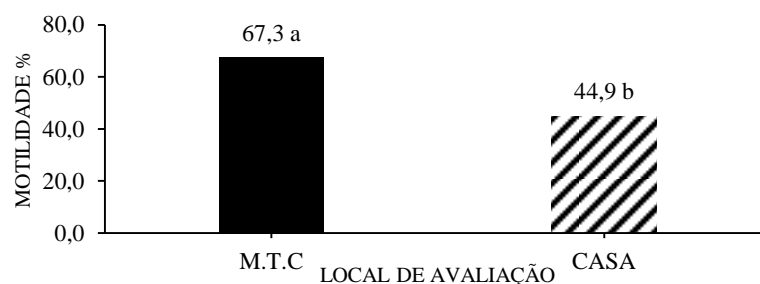


Plexo Direito (PD); Velocidade Sistólica do Pico (PSV); Velocidade Diastólica Final (EDV) e a Velocidade Máxima do Tempo (TAMV). Fonte: Arquivo Pessoal.

Resultados

Observou-se diferença ($P > 0,05$) entre os parâmetros de motilidade subjetiva, avaliada a campo, e motilidade total avaliada no sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA) (Fig. 3).

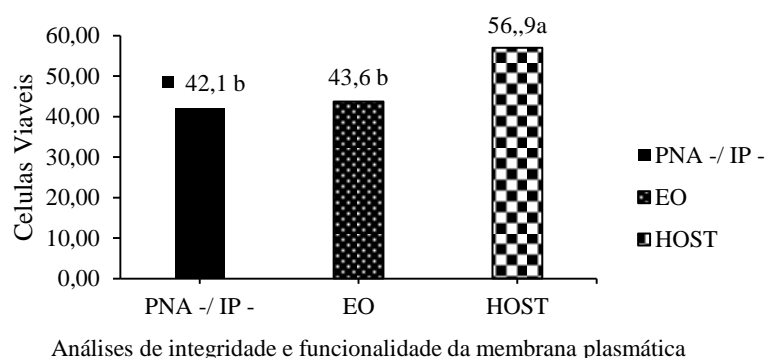
Figura 3. Parâmetros de motilidade espermática equina avaliados de forma subjetiva (Motilidade Total a Campo; M.T.C); e de forma objetiva (sistema informatizado para análise de espermatozoide; CASA)



Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste F ($P < 0,05$).

A análise do teste de integridade de membrana plasmática (método dupla coloração com eosina-nigrosina) não apresentou diferença ($P > 0,05$) quando comparada às análises realizadas no laboratório através das sondas fluoróforas (Fig. 4). Já o teste de funcionalidade de membrana (HOST) apresentou diferença ($P < 0,05$) quando comparado com a integridade de membrana tanto pelo método de coloração a campo quanto através das sondas fluoróforas.

Figura 4. Parâmetros de integridade de membrana plasmática (EO), funcionalidade da membrana plasmática (HOST) e integridade de membranas plasmática e acrossomal (CF) de equinos criados no estado da Paraíba



Médias seguidas de letras diferentes indicam significância ($P < 0,05$; Teste F). EO: eosina-nigrosina; HOST: teste hiposmótico; CF: citometria de fluxo. PNA: fluoróforo Isoticianato de Carboxifluoresceína conjugado à lectina do amendoim; IP: iodeto de propídeo.

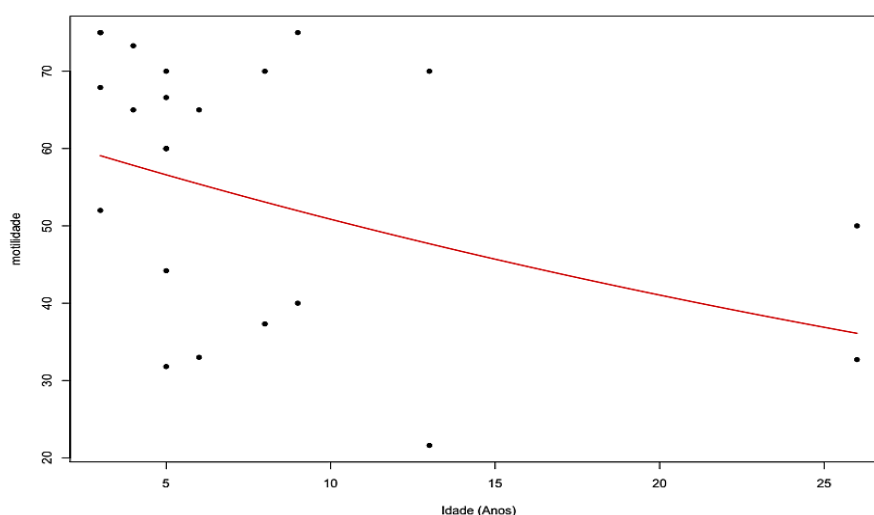
Durante a avaliação clínica e hematológica nos animais do experimento não foi observada diferença nos parâmetros vitais e na análise hematológica, independentemente da idade dos animais, os resultados permaneceram dentro dos valores de referência (Fig. 5). Apesar disto, houve variação ($P < 0,05$) no percentual da motilidade de campo em relação à idade dos garanhões (Fig. 6). No intervalo entre as idades de cinco a dez anos, os animais apresentaram motilidade $\leq 70\%$. Contudo, verificou-se que animais com idade superior a 10 anos apresentaram motilidade $\leq 50\%$.

Figura 5. Média dos parâmetros obtidos entre os animais submetidos aos exames clínicos (valores obtidos) e os valores de referência para a espécie equina, de acordo com cada parâmetro

AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS		
	VAL. OBTIDOS	VAL. REFERÊNCIA
PARAMETROS VITAIS		
Freq. Cardíaca (bpm)	36	28 a 40
Freq. Respiratória (mrpm)	10	8 a 16
TPC	2	2
Temperatura	38	37,5 a 38,5
ERITOGRAMA		
Hemácias ($\times 10^3/\text{mm}$)	6,9	6,5 a 12,5
Homoglobina (G/dl)	12,3	11 a 19
Hemátocrito %	37	32 a 52
VGM (FL)	61.0	34 a 58
CHGM (%)	33.2	31 a 37
Plaquetas mm^3	372.100	200,00 a 500,00

Batimentos por Minuto (bpm); Movimentos Respiratório por Minuto (mrpm); Tempo de Perfusão Capilar (TPC); Temperatura Corporal (TC°); Volume Globular Médio (VGM); Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHGM); Porcento (%).

Figura 6. Função exponencial da variável motilidade espermática em função da idade dos garanhões avaliados no estado da Paraíba



Observou que o índice de resistividade apresentou diferença ($P<0,05$) quando comparada à idade dos animais (Fig. 7). Os animais adultos observados demonstraram um ciclo cardíaco mais curto, diminuindo o aporte sanguíneo nos testículos.

Os parâmetros do Doppler velocimétricos índice de resistência (IR) e índice de pulsatilidade (IP), e as análises de parâmetros cinéticos da célula espermática mostraram que índice de Pulsatilidade tem uma correlação positiva com amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) (Fig. 8).

Figura 7. Relação do parâmetro ultrassonográfico índice de resistência (IR) testicular e a idade dos equinos criados no estado da Paraíba

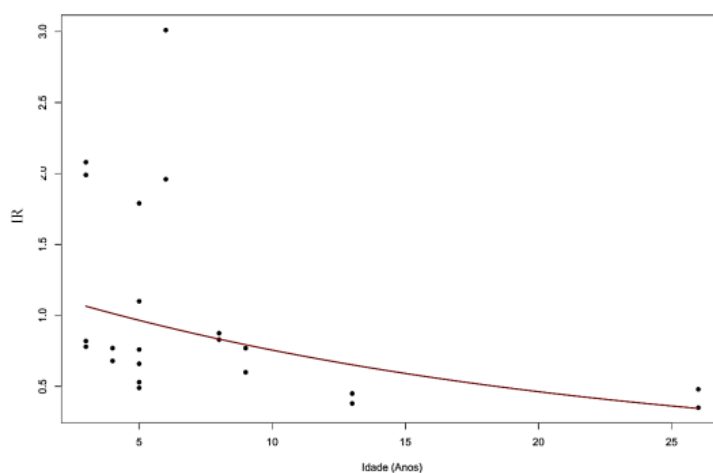
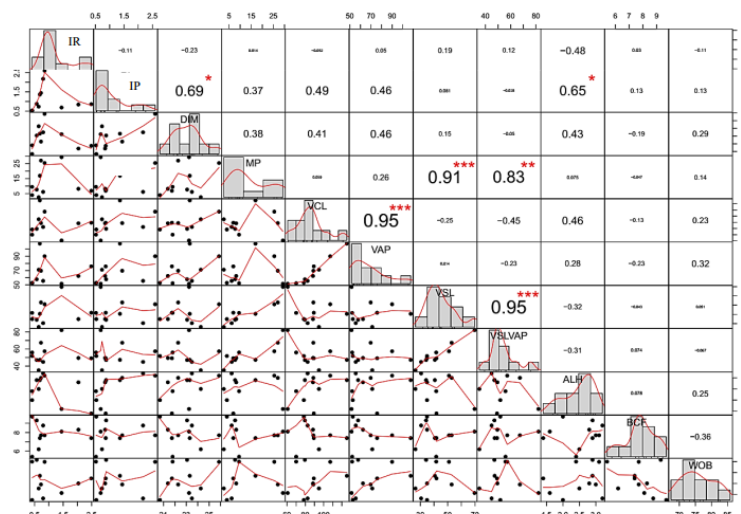


Figura 8. Análise de correlação simples entre os Índices Doppler velocimétricos IR e IP e a análise objetiva do sêmen de equinos submetidos ao exame clínico-andrológico no estado da Paraíba



Índice de Pulsatilidade (PI), Índice de Resistência (RI), Dimensões Testicular (DM), Motilidade Progressiva (MP), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Média do Trajeto (VAP), Velocidade Linear Progressiva (VSL), Retilinearidade (VSL/VAP), Amplitude de Deslocamento da Cabeça (ALH), Frequência Batimento Flagelar (BCF).

Durante a avaliação da fertilidade dos garanhões na estação de monta, observou-se que animais jovens, apresentaram taxa de fertilidade superior aos animais adultos (Fig. 9).

Figura 9. Taxa de fertilidade dos reprodutores equinos submetidos aos exames clínicos andrológicos criados no estado da Paraíba durante o período de estação de monta

TAXA DE FERTILIDADE DA ESTAÇÃO				
ANIMAL	IDADE	Nº DE ÉGUAS I.A.	Nº DE COL. SEM.	%PRENHEZ
B	3	8	1	92%
D	3	16	1	77%
F	4	11	1	81%
E	5	8	1	50%
J	5	32	3	80%
K	5	54	3	87%
A	6	13	1	75%
I	8	15	2	77%
G	9	10	1	100%
C	13	20	2	90%
H	27	33	3	50%

Inseminadas (I.A); Número (Nº); coletas (COL); Semana (SEM), Porcento (%).

Discussão

Observou-se que a motilidade subjetiva a campo foi superior à análise de motilidade realizada pelo método automatizado (CASA). É importante ressaltar que na análise subjetiva, o nível de correlação pode sofrer uma variação entre 0,15 e 0,83 (Januskaukas et al., 2003) e a estimativa pela análise computadorizada, entre 0,82 e 0,98 (Farrell et al., 1998). Segundo Carvalho et al. (2009), durante a avaliação subjetiva, há uma tendência em se superestimar a percentagem de espermatozoides móveis, especialmente em amostras com alta concentração espermática

Entretanto deve-se levar em consideração que as amostras foram acondicionadas, refrigeradas e transportadas para análise de uma cidade para outra. Alberts et al. (1999) afirmam que os espermatozoides de algumas espécies são resistentes a refrigeração por apresentar altas concentrações de colesterol na membrana plasmática, que atua estabilizando a membrana plasmática e reduzindo a faixa de temperatura para a fase de transição. Segundo Hartwig et al. (2012), espermatozoides equinos são considerados susceptíveis às lesões causadas pela refrigeração, por apresentarem baixas concentrações de colesterol. As avaliações realizadas neste estudo

mostraram que em condições de campo, a célula espermática tende a possuir maior motilidade, entretanto pós-refrigeração essas células diminuem a motilidade, como observado na avaliação fornecida pelo método CASA.

Ao avaliar a integridade e funcionalidade de membrana espermática, observou-se correlação direta entre a eosina/nigrosina e a sonda Iodeto de Propídeo (IP), pois ambos os testes avaliam a integridade de membrana. Pintado et al. (2000) ratificaram o papel do IP como um bom indicador de células lesadas, pois observaram correlação positiva com a eosina/nigrosina/giemsa. O IP é um corante com afinidade para com o ácido nucleico e sonda identifica espermatozoides mortos, corando seu núcleo em vermelho, pois a membrana plasmática quando intacta impede sua penetração na célula (Garner et al., 1986). Esta observação, no presente experimento, reforça que o teste eosina/nigrosina pode ser utilizado de forma segura a campo, pois os resultados obtidos são compatíveis à técnica de citometria de fluxo, sendo o primeiro um teste mais barato e prático de execução a campo para andrológico em equinos.

Vale ressaltar que a idade interferiu negativamente sobre a manutenção da motilidade. Roser (2001) cita a hipótese de garanhões com idade acima de quinze anos apresentarem redução na fertilidade, condição associada à redução na produção de espermatozoides com motilidade progressiva, possível degeneração testicular, impotência, baixa libido e diminuição da capacidade de monta; estas falhas reprodutivas iniciam-se precocemente, em nível testicular, evoluindo para o sistema endócrino, hipotálamo, na região produtora de GnRH, e na adenohipófise, região produtora de gonadotrofinas.

Turner (2012) afirma que a fisiopatologia da degeneração senil esta relacionada com a queda na produção de estrógenos e gametas. Entretanto esse mecanismo da degeneração testicular ocasionada pelo envelhecimento é extremamente complexo no garanhão, pois apresentam sinais clínicos não específicos e progressivos, como a queda na qualidade do ejaculado, macies testicular e redução no parênquima.

Entretanto, o fator nutricional é citado por Arruda et al. (2010), que orienta o cuidado com a nutrição dos animais idosos, que é fundamental para a obtenção de bons resultados na reprodução. Nas condições deste experimento podemos descartar a questão alimentar, visto que os animais receberam alimentação balanceada de acordo com a idade. Desta forma, é interessante abordar possíveis falhas reprodutivas.

Pavlica e Barozz (2001) citam que a funcionalidade do testículo está associada a uma boa perfusão testicular. Esta afirmação justifica os resultados encontrados neste experimento, que durante avaliação Doppler os animais adultos apresentaram o índice de resistividade menor em comparação aos animais mais jovens. Schurich et al. (2009) citam que o índice de resistência (IR) tem relação direta com a perfusão normal nos tecidos; qualquer alteração tissular nos testículos acarreta em alterações nas células espermáticas, já que a massa testicular é constituída entre 70 a 80 % de túbulos seminíferos, e esses possuem uma concentração de oxigênio relativamente baixa quando comparado com outros órgãos. Menor resistividade indica maior fluxo sanguíneo, que eleva a temperatura testicular aumentando o metabolismo e a demanda de oxigênio pode culminar em degeneração testicular, prejudicando a espermatogênese.

Os valores de IP e IR, quando medidos no plexo testicular, contribuem para reforçar a diminuição da motilidade em animais mais velhos (Batissaco, 2013). Verstegen et al. (2002) afirmam que a mensuração da ALH está relacionada com a capacidade de penetração na zona pelúcida do oócito, assim, a ALH é um dos parâmetros que exerce efeito sobre a fertilização. Estes estudos podem explicar a correlação positiva entre o índice de pulsatilidade e a amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH). O aumento da ALH pode justificar a diminuição da fertilidade de reprodutores mais velhos, principalmente quando utilizada a inseminação com sêmen refrigerado, uma vez que o sêmen apresentaria menor tempo de viabilidade no trato reprodutor da fêmea e comumente a inseminação não ocorrer no momento da ovulação.

O exame andrológico, pela avaliação dos parâmetros de motilidade subjetiva e integridade de membranas não justificariam a diminuição da fertilidade em animais mais velhos, assim como a alteração nos parâmetros cinéticos, entretanto, a associação com a ultrassonografia pôde fundamentar tais achados.

Conclusão

O exame clínico-andrológico, de forma isolada, não é capaz de determinar a capacidade fértil de garanhões; a ultrassonografia associada ao método Doppler pode ser uma ferramenta auxiliar na seleção de reprodutores equinos.

Referências

- Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba (AESA) Disponível em: <http://www.aesa.pb.gov.br/aesa-website/meteorologiachuvas/climatologia>. Acesso em 01 de janeiro de 2017.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON. et al. Estrutura da membrana. Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula. *Art. Méd. Sul*, v.1, cap.11, p.354-378, 1999.
- ARRUDA, R.P.; SILVA, D.F.; ALONSO, M.A. et al. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. *Rev. Bras. Zootec*, v.39, p.393-400, 2010.
- BATISSACO L.; CELEGHINI E.C.C.; PINAFFI, F.L.V. et al. Correlations between testicular hemodynamic and sperm characteristics in rams. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.50, n.5, p.384-395, 2013.
- CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; LEMES, A.P. et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesq. Agrop. Bras*, v.44, n.10, p.1346-1351, 2009.
- CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal: Belo Horizonte, 2013.
- FARREL, P. B.; FOOTE, R. N.; MCARDLE, M.M. et al. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit and bull sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *J. Androl*, v.17, p.293-300, 1996.
- GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. *Biol. Reprod*, v.34, p.127-138, 1986.
- HAMMES, A. M.; PIMENTEL, C. A.; FERNANDES, C. E. Fertilidades em garanhões avaliadas através do exame andrológico. *Ciênc. Rural*, v.26, p.277-283, 1996.
- HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: uma revisão. *Vet. Zootec.*, v.19, p.157-168, 2012.

- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*, v.60, p.743-758, 2003.
- OBINO FILHO, F. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Assessoria de Comunicação e Eventos, p. 7, 2016. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>
- ORTIZ-RODRIGUEZ, J.M.; ANEL-LOPEZ, L.; MARTÍN-MUÑOZ, P. et al. Pulse Doppler ultrasound as a tool for the diagnosis of chronic testicular dysfunction in stallions. *PLoS ONE*, v. 12, 2017.
- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; DELL AQUA, J.R.J.A.; MONTEIRO, G.A. Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen Equino, p. 19, 2011. Disponível em:
- PAVLICA, P.; BAROZZI, L. Imaging of the acute scrotum. *Europ. Radiol*, v.11, p.220-228, 2001.
- PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability, of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil*, v.118, p.145-152, 2000.
- ROSER, J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim. Reprod. Sci.*, v.68, p.139-51, 2001.
- SCHURICH, M.; AIGNER, F.; FRAUSCHER, F.; PALLWEIN, L. The Role of Ultrasound in Assessment of Male Fertility. *Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol*, v.144 p.192–198, 2009.
- SNOECK, P.P.N.; MELO, M.I.V., ALVES, S.G.G. et al. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados? *Rev. Bras. Med. Vet*, v. 36, n.2, p.00-00, 2014.
- TURNER, R.M.; ZENG, W. The Emerging Pathophysiology of Age-related Testicular Degeneration with a Focus on the Stallion and an Update on Potential Therapies. *Reproduction In Domestic Animals*, v. 47, p. 178-186, 2012.
- VERSTEGEN, J.; IGUER OVADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzer in Andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p. 149-179, 2002.

ANEXO A – NORMAS PARA A ELABORAÇÃO DE ARTIGO CIENTÍFICO PARA A REVISTA ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Tipo de artigo aceito para publicação:

Artigo científico: É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa. Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na “Title Page” – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências. O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências. O número de Referências não deve exceder a 30.

Preparação dos textos para publicação: os artigos devem ser redigidos em português ou inglês na forma impessoal.

Formatação do texto: o texto NÃO deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como “Main Document” (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas; não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo: **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras; **Autores e Afiliação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no “Title Page” (Step 6), em arquivo Word. **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa. Palavras-chave e Keywords. No máximo cinco e no mínimo duas*. * na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independentemente do idioma em que o artigo for

submetido. **Introdução.** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la. **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA (anexar certidão em PDF). **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados. **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação. **“Nota”:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências. **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes). **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, SEM revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e

especulações. **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências. As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, adaptadas para o ABMVZ, conforme exemplos:

Como referenciar: 1. **Citações no texto.** A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos: autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88); dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974); mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979); mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação. Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal. Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores

et al.): **ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.**

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. Am. J. Vet. Res., v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. Not. Med. Vet., n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.): DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

- LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. Anais... São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).
- MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.
- NUTRIENT requirements of swine. 6a ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.
- SOUZA, C.F.A. Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
4. Documentos eletrônicos (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores et al.): QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.
- JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

